Viorel ORDEANU

Manuela Anda RADU POPESCU Gabriela BANCESCU

Roxana SANDULOVICI Constantin MIRCIOIU

ELEMENTE DE MICROBIOLOGIE FARMACEUTICĂ

Ediţia a II-a adăugită şi revizuită

IV 82.318

Editura Universitară "Carol Davila"
Bucureşti, 2010

Viorel ORDEANU

Manuela Anda RADU POPESCU

Gabriela BANCESCU

Roxana SANDULOVICI

Constantin MIRCIOIU

578 808

ELEMENTE DE MICROBIOLOGIE FARMACEUTICA

Editia II-a adaugita si revizuita

ALE

Editura Universitara „Carol Davila"
Bucuresti, 2010

000004 92639
BCU Iasi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Editura Universitară „Carol Davila" Bucureşti a
U.M.F. „Carol Davila" Bucureşti este acreditată de
Consiliul Naţional al Cercetării Ştiinţifice din Învăţământul Superior
(CNCSIS), cu avizul nr. 11/23.06.2004

În conformitate cu prevederile Deciziei Nr. 2/2009 a Consiliului Naţional din România – privind stabilirea sistemului de credite de educaţie medicală continuă, pe baza căruia se evaluează activitatea de perfectionare profesională a medicilor, a criteriilor şi normelor de acreditare a educaţiei medicale continue, precum şi a criteriilor şi normelor de acreditare a furnizorilor de educaţie medicală continuă,
Colegiul medicilor din România
acreditează (recunoaşte)
EDITURA UNIVERITARĂ CAROL DAVILA, BUCUREŞTI CA FURNIZOR EMC

Publicarea acestei carti de microbiologie este finantata de MEdCI / ANCS prin Proiectul de cercetare PNCDI / Parteneriate / BIODEM etapa 2010

I.S.B.N.: 978-973-708-324-1

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10. MAI. 2012

CUPRINS

INTRODUCERE (*V. Ordeanu)* p.4
CUVANT INAINTE (*C. Mircioiu)* p.5
CAPITOLUL 1. Microbiologie medicala speciala (*Manuela Anda Radu Popescu)* p.7
CAPITOLUL 2. Efecte ale medicamentelor la nivelul membranelor bacteriene (*C. Mircioiu)* p.22
CAPITOLUL 3. Rezistenta microbiana si infectiile nosocomiale (*V. Ordeanu)* p.31
CAPITOLUL 4. Fenomenul de rezistenta bacteriana la substante antimicrobiene (*V. Ordeanu, G. Bancescu)* p.34
CAPITOLUL 5. Substante antimicrobiene utilizate in terapia si profilaxia infectiilor (*V. Ordeanu, G. Bancescu)* p.50
CAPITOLUL 6. Supravegherea, prevenirea si controlul infectiilor nosocomiale (*V. Ordeanu)* p.63
CAPITOLUL 7. Antibioticele testate pentru eficienta activitatii antibacteriene *in vitro* *(V. Ordeanu)* p.76
CAPITOLUL 8. Controlul starii igienico-sanitare in unitati spitalicesti (*V. Ordeanu)* p.104
CAPITOLUL 9. Organismele modificate genetic si rolul lor in biotehnologie *(V. Ordeanu)* p. 128
CAPITOLUL 10. Asigurarea calitatii in laboratorul de microbiologie (*R. Sandulovici)* p.155
INDEX DE TERMENI p.165

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE

Lucrarea de fata se doreste a fi o culegere de elemente de microbiologie, destinata in primul rand studentilor farmacisti, care invata disciplina de „Microbiologie generala si farmaceutica". Intentia noastra este de a le creea o cultura generala medico-farmaceutica in domeniul microbiologiei, de a avea o baza de discutii la sedintele Cercului de microbiologie farmaceutica, de a le trezi interesul pentru o disciplina, care desi pare „secundara" pentru viitorii farmacisti, este foarte importanta prin conexiunile cu toate celelalte discipline si contribuie la formarea unei gandiri cuprinzatoare asupra stiintelor farmaceutice. Credem ca pe aceasta baza vor fi mai bine si mai usor intelese, si retinute, notiunile din programa universitara de profil.

Manuscrisul a fost redactat de un colectiv de cadre didactice din Universitatea de Medicina si Farmacie „Carol Davila" din Bucuresti, sub coordonarea Dr. Viorel Ordeanu, microbiolog, cercetator stiintific gradul I, care sustine Cursul teoretic si Lucrarile practice, impreuna cu Conf. Dr. Gabriela Bancescu si cu Sef lucrari Dr. Manuela Anda Radu Popescu, iar aspectele conexe programei au fost dezvoltate de Prof. Dr. farm. Constantin Mircioiu si Asist. Dr. farm Roxana Sandulovici.

In mod firesc, lucrarea este perfectibila si se preteaza la completari ulterioare, pentru abordarea cat mai multor aspecte esentiale sau nou aparute in domeniu.

*Dr. **Viorel Ordeanu**, CS I*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVANT INAINTE

De ce microbiologie farmaceutica?

Farmacistul: profesie a carei denumire deriva de la "farmacon" – medicament in greaca – este implicat esential in aproape toate etapele parcurse de medicament, de la proiectare, productie si pana la utilizarea lui practica la pacient.

Stabilirea limitelor contaminarii medicamentului cu germeni patogeni sau nepatogeni, controlul acestora, precum si masurile de prevenire a contaminarii implica in mod necesar si farmacistul.

Un alt capitol, din nefericire din ce in ce mai amplu, ce implica si farmacistul si microbiologie, este cel al decontaminarii. Infectiile nosocomiale, poate nu mai multe ca numar, dar cert in crestere ca gravitate, raman o continua amenintare si sfidare. Germenii patogeni "crescuti" in mediul salilor de operatie nu mai pot fi distrusi decat cu focul.

Lumea farmaceutica si cea medicala in general au constientizat in ultimii ani ca batalia cu "microbii" a fost, din diverse cauze, pierduta.

Prima sfidare a cercetarii farmacologice, inainte de tratamentul bolilor cardiovasculare si cel al cancerului, o constituie in momentul de fata, terapia antiinfectioasa. Instalarea rezistentei germenilor patogeni, combinata cu dezvoltarea unor mecanisme de eliminare a xenobioticelor de catre organismul uman a dus la o crestere foarte mare a rezistentei la terapia infectiilor microbiene.

Dincolo de batalia pierduta apare insa si spectrul infricosator al piederii razboiului. Descoperirea de noi antibiotice si chimioterapice bate pasul pe loc de multi ani. Este nevoie de o cercetare aprofundata a mecanismelor de transport si de actiune la nivel membranar sau la nivelul altor situsuri active pentru a putea concepe noi medicamente. Si la acest nivel este necesara, inca o data, implicarea farmacistului

Pregatirea in cadrul cursurilor de microbiologie in cadrul facultatii de farmacie a ramas cu mult in urma acestor cerinte, in primul rand prin aceea ca facultatea nu a avut un colectiv de cadre didactice propriu si in acest domeniu, cursurile fiind desfasurate in cadrul facultatii de stomatologie. Prevederile Decretului nr. 432/1985 – privind cerintele minime obligatorii ale invatamantului farmaceutic, pentru a putea fi recunoscute studiile in Uniunea Europeana, includ: „Cunostinte despre testarea microbiologica a medicamentelor"

Conducerea Facultatii de Farmacie a propus si a obtinut aprobarea conducerii Universitatii de Medicina si Farmacie „Carol Davila" Bucuresti pentru infiintarea disciplinei de „Microbiologie farmaceutica" in cadrul Facultatii de Farmacie urmand ca, dupa incadrarea posturilor, sa se modernizeze si programa de invatamant in conformitate cu legea si in conformitate cu cerintele stringente ale cercetarii si practicii farmaceutice.

Culegerea de prelegeri de fata constituie un „foarte inceput" al acestei actiuni necesare si urgente pe un drum al carui capat ar tebui sa nu fie prea departe.

Prof. Dr. farm. ***Constantin Mircioiu***

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 1
NOTIUNI DE MICROBIOLOGIE MEDICALA SPECIALĂ

1. Infectii cu coci Gram-pozitivi

1.1. Genul Staphylococcus

Clasificarea *Staphylococcus spp.* cu importanta clinica in patologia umana

Genul Staphylococcus:

Staphylococcus aureus subsp. aureus

S. epidermidis

S. saprophyticus

S. haemolyticus

S. warneri

S. hominis

S. simulans

S. schleiferi

S. capitis

S. auricularis

S. pasteuri

S. caprae

S. ochnii

S. xylosus

S. saccharolyticus

Stafilococii sunt coci Gram-pozitivi, cu forma sferica, aşezati in gramezi, dar şi in diplo, lanţuri sau tetrade, imobili, nesporulaţi, catalazo-pozitivi, aerobi, facultativi anaerobi.

Afecţiuni produse

S. aureus: abcese, foliculita, impetigo, mastita, infecţii de plaga, meningita, pericardita, pneumonie, osteomielita, artrita septica, toxiinfecţii alimentare, sindrom de şoc toxic etc.

Stafilococii coagulazo-negativi, in funcţie de specie sunt implicaţi in: bacteriemie nozocomiala, infecţii de cateter, meningita la pacienţi cu şunt ventriculo-peritoneal, endocardita, septicemie etc.

S. saprophyticus este agent etiologic al infecţiilor urinare joase.

Infecţiile cu *S. aureus meticilino-rezistent* (MRSA) datorita rezistenţei bacteriei la majoritatea antibioticelor reprezinta un impas in tratamentul pacienţilor atât in cazul infecţiilor nozocomiale şi mai recent al celor comunitare.

Factorii de virulenţa

S aureus exprima o multime de factori de virulenta: capsula polizaharidica, peptidoglicanul si acidul teichoic, proteina A, enzime, hemolizine, toxine

Diagnosticul de laborator

Rezultatele investigatiilor de laborator contribuie la stabilirea unui diagnostic corect si a deciziei terapeutice.

Recoltarea si transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de catre medicul clinician si/sau asistent. Rezultatele investigatiilor microbiologice depind de calitatea recoltarii.

Examenul microscopic direct

Coloraţia Gram: coci Gram-pozitivi, dispuşi în grămezi asemănătoare ciorchinilor de strugure, localizati intra si perileucocitar; prezenta celulelor inflamatorii este dovada ca s-a recoltat un produs patologic real, de la locul infectiei.

Tehnicile pentru cultivarea si identificarea bacteriei.

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se insamanteaza pe medii lichide si pe medii solide, iar produsele patologice contaminate sunt insamantate pe medii selective.

Insamantarea produselor patologice se face in poligon deschis cu scopul obtinerii coloniilor microbiene izolate.

Incubare aerobă la 37°C, 18–24 ore.

Testele uzuale pentru identificarea *Staphylococcus spp.* sunt: testul coagulazei pe lama, testul coagulazei in tub, testul deoxiribonucleazei (DNASE), testul endonuclezei termostabile, fermentarea zaharurilor. Identificarea la nivel de specie se poate face cu ajutorul truselor API, analizoarelor automate de bacteriologie, de asemenea se folosesc truse pentru identificare prin latex-aglutinare.

Metodele moleculare de diagnostic au un rol foarte important in identificarea rapida a bacteriei si determinarea profilului de rezistență.

Antibiograma este obligatorie in infecțiile cu tulpini de *Staphylococcus*.

Conform recomandărilor OMS/CLSI, se realizeaza pe mediul agar Mueller-Hinton, inocul 0,5 McFarland, temperatură 35°C, incubare 18 pana la 24 ore. Pentru a stabili daca este un *Staphylococcus meticilino-rezistent*, tulpina izolata se testează cu discuri de oxacilina și cefoxitin[4].

Control

Pacienții purtatori sau cu infecție cu tulpini MRSA sunt izolați in rezerve și urmează recomandările programului de control al infecțiilor nozocomiale.

Bibliografie

(1) Andrei MA, Rugina M, Filipescu D, Bradisteanu SA. Guide for sample collecting and transport--the necessity for establishing the correct microbiological diagnosis. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol PubMed. 2004;49(3-4):175-86.

(2) CDC. Outbreaks of community -associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections.Los Angeles county, California 2002-2003. JAMA. 2003;289:1377.

(3) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

(4) Gabriela Bancescu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(5) M.Andrei. The quality of medical care . Prevention of "Staphylococcus aureus Methicillino-Resistent "- (MRSA) Spreading". Annals of Plastic and Reconstructive Microsurgery. 2003;2: 60-65.

(6) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Staphylococcus spp. Lucrari practice, anul II Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(7) Mary J.R.Gilchrist. Enterobacteriaceae: Opportunistic Pathogens and Other Genera. In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., ASM Press, 6 ed. 1995:457-64.

(8) Viorel Ordeanu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(9) Warren Levinson, E Jawetz. Gram-Negative Rods related to the Enteric Tract. In Medical Microbiology & Immunology.APPLETON & LANGE,USA,4 ed. 1996:94-112.

1.2. Genul Streptococcus

Clasificarea *Streptococcus spp.* cu importanta clinica in patologia umana

Genus Streptococcus

Grupul piogen

S. pyogenes (Streptococi beta-hemolitici grup A)

S. agalactiae (Streptococi beta-hemolitici grup B)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

S. dysgalactiae subsp. equisimilis (Streptococi beta-hemolitici grup C si G)

Grupul sanguis

Grupul mitis

Grupul mutans

Grupul salivarius

Grupul anginosus

Grupul bovis

Streptococcus pneumoniae

Streptococii sunt coci Gram-pozitivi aşezaţi in lanţuri sau perechi , cu câteva caractere metabolice comune: absenţa catalazei şi a oxidazei; sunt facultativ anaerobi deşi unele specii cresc mai bine in condiţii anaerobe, sunt homofermentativi, imobili, nesporulaţi si se dezvolta pe medii cu sange.

Sunt larg răspânditi în natură, găzduiti de om si diverse animale. Unii fac parte din microbiocenoza obisnuita (indigenă) a tractului respirator, digestiv si genital; alţii sunt asociaţi cu afecţiuni umane importante.

Streptococcus pneumoniae sunt coci Gram-pozitivi, alungiţi, lanceolaţi, dispuşi în general în diplo sau în lanţuri scurte, sunt imobili, nesporulaţi.

Tulpinile patogene prezintă capsulă care înconjoară pneumococii. Sunt aerobi si facultativ anaerobi, multiplicarea lor fiind favorizată de o atmosferă de 5% CO_2.

Afecţiuni produse

Streptococcus pyogenes: faringita, scarlatina, impetigo, celulita, erizipel, fasciita necrozanta, miozita, sindrom de şoc toxic; complicatii non-supurative: febră reumatică, glomerulonefrită acută, coree, eritem nodos, cardita.

S. agalactiae: pneumonie, sepsis si meningită la nou născuti, de aceea este obligatoriu screening-ul gravidelor in săptămânile 35-37 de sarcina.

La adulţi au fost implicaţi în infecţii post-partum, infecţii ale tegumentului, ţesuturilor moi, osteomielite , endocardita , infecţii de tract urinar etc.

Streptococci viridans: endocardita

Streptococcus pneumoniae: bronşită, pneumonie, sinuzită, otită medie acută, mastoidită, meningită, endocardită, conjunctivită etc

Factorii de virulenţa

Streptococcus pyogenes: proteina M, acidul lipoteichoic, acidul hialuronic capsular, exotoxina pirogenica, streptokinaza, streptodornaza (DNASE B), streptolizine etc.

S. agalactiae: capsula polizaharidică, proteina B, hemolizina, hialuronidaza etc.

Streptococcus pneumoniae: multiplicare, invazivitate, capsula polizaharidică, pneumolizina etc.

Diagnosticul de laborator

Rezultatele investigatiilor de laborator contribuie la stabilirea unui diagnostic corect si a deciziei terapeutice.

Recoltarea si transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de catre medicul clinician si/sau asistent. Rezultatele investigatiilor microbiologice depind de calitatea recoltarii[2].

Examenul microscopic direct

Coloraţia Gram: coci Gram-pozitivi, dispuşi în lanţuri sau perechi, localizati intra si perileucocitar; nu este necesara efectuarea examenului microscopic direct (frotiu din produsul patologic) in cazul unei suspiciuni de faringita cu Streptococcus pyogenes. Nu este necesara efectuarea examenului microscopic direct in cazul screening-ului pentru Streptococcus grup B.

Sputa trebuie sa conţina numeroase polimorfonucleare şi foarte rare celule epiteliale (raportul PMN/celule epiteliale este aproximativ de 10 pana la 20:1), coci lanceolaţi Gram-pozitivi, capsulaţi, fibrina.

PCUM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnicile pentru cultivarea si identificarea bacteriei.

Streptococii se dezvolta pe medii geloză-sânge cu sânge de berbec sau de cal, iar in cazul prelevatelor cu flora de asociație se însămânțează și pe medii selective.

Pneumococii sunt germeni pretențiosi, de aceea necesită medii îmbogățite cu sânge, ser, lichid de ascită, glucoză.

Insamantarea produselor patologice se face in poligon deschis cu scopul obtinerii coloniilor microbiene izolate.

Incubare la 35-37°C, 18–24 ore; pneumococii necesita 5%CO_2

Testele uzuale pentru identificarea Streptococcus spp. sunt: testul de sensibilitate la bacitracina (este prezumtiv) si face diferenta intre S. grup A și alți streptococi beta hemolitici; sensibilitatea la vancomicină, sulfametoxazol-trimetoprim, hidroliza L-pyrolidonyl-β-naphtylamidă (PYR), producerea unei proteine difuzibile care acționează sinergic cu beta-hemolizina stafilococică determinând liza completă a hematiilor din mediul de cultură (testul CAMP) etc.

Testele de identificare definitiva sunt cele de identificare serologică (prin reacții de latex-aglutinare, coaglutinare) a grupelor de streptococi.

Diagnosticul serologic – dozarea anticorpilor antistreptolizina O (ASLO)

Diagnosticul pneumoniei pneumococice este clinic, radiologic și bacteriologic (fermentarea inulinei, testul bilolizei, testul de sensibilitate la optochin, reactia de umflare a capsulei cu seruri specifice ce conțin anticorpi anticapsulari)

Real-time PCR detecteaza pneumococii direct din lichid cefalorahidian si sange[25]

Antibiograma nu este obligatorie deoarece Streptococcus grup A si-a pastrat sensibilitatea la penicilina, se recomanda efectuarea antibiogramei in cazul pacientilor alergici la peniciline. Conform recomandărilor CLSI, testarea sensibilitatii se realizeaza pe mediul agar Mueller-Hinton cu 5% sânge de berberc, inocul 0,5 McFarland, temperatură 35°C, incubare 20 - 24 ore, 5% CO_2.

In infectiile pneumococice antibiograma este obligatorie datorita aparitiei tulpinilor rezistente.

Conform recomandărilor CLSI, testarea sensibilitatii la penicilina se realizeaza cu microcomprimate de oxacilina de 1 µg/mcp, pe mediul agar-Muller Hinton cu 5% sânge de berberc, inocul 0.5 McFarland, temperatură 35°C, incubare 20 - 24 ore, 5% CO_2.

Bibliografie

(1) Andrei MA, Rugina M, Filipescu D, Bradisteanu SA. Guide for sample collecting and transport--the necessity for establishing the correct microbiological diagnosis. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol PubMed. 2004;49(3-4):175-86.

(2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

(3) Gabriela Bancescu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008.Ref Type: Unpublished Work

(4) Kathryn L Ruoff. Streptococcus. In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., ASM Press, 6 ed. 1995:299-308.

(5) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Streptococcus pneumoniae. Lucrari practice microbiologie, studenti anul II Facultatea de Farmacie. 2008. ref Type: Unpublished Work

(6) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Streptococcus spp. Lucrari practice microbiologie, studenti anul II Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(7) McAvin JC, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of Streptococcus pneumoniae using real- time fluorescence PCR. J Clin Microbiol. 2001;39:3446-3451.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(8) Viorel Ordeanu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(9) Warren Levinson, E Jawetz. Gram-Positive Cocci. In Medical Microbiology & Immunology.APPLETON & LANGE,USA,4 ed. 1996:73-80.

Genul Enterococcus

Clasificarea Enterococcus spp. cu importanta clinica in patologia umana:

E. faecalis,

E. faecium (grupul 2)

Enterococcus spp. sunt coci Gram-pozitivi, ovali sau cocobacili, dispusi izolat, în perechi sau lanțuri scurte. Sunt aerobi facultativ anaerobi, imobili, nesporulați, necapsulați, catalazo-negativi, oxidazo-negativi.

Sunt componenți ai florei comensale a tractului digestiv și genito-urinar, al omului si animalelor de unde ajung în mediul extern.

Afecțiuni produse

Infecții ale tractului urinar, bacteriemie, endocardita, infectii intraabdominale si pelviene, infectii de plaga, sepsis neo-natal, infecții nosocomiale etc.

Factorii de virulența

În patogenitatea tulpinilor de enterococ sunt implicați următorii factori de virulență: hemolizina/bacteriocina, factorul de agregare, gelatinaza, acidul lipoteichoic.

Diagnosticul de laborator

Rezultatele investigatiilor de laborator contribuie la stabilirea unui diagnostic corect si a deciziei terapeutice.

Recoltarea si transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de catre medicul clinician si/sau asistent. Rezultatele investigatiilor microbiologice depind de calitatea recoltarii.

Examenul microscopic direct este util pentru prelevatele în mod curent sterile.

Tehnicile pentru cultivarea si identificarea bacteriei.

Se insamanteaza pe agar cu sange de berbec, iar produsele patologice contaminate sunt insamantate pe medii selective. Insamantarea produselor patologice se face in poligon deschis cu scopul obtinerii coloniilor microbiene izolate

Incubare aerobă la 37°C, 18–24 ore.

Testele uzuale pentru identificarea Enterococcus spp. sunt: testul bilă-esculină; toleranța la 6,5% NaCl, producerea de pyrolidonyl-arylamidază (PYR), leucinaminopeptidază, sensibilitate la vancomicină, fermentarea zaharurilor, hidroliza argininei, testul toleranței la telurit, testul mobilității, pigmentația etc. Identificarea la nivel de specie se poate face cu ajutorul truselor API, analizoarelor automate de bacteriologie.

Metodele moleculare si genetice pentru identificarea si determinarea profilului de rezistență a Enterococcus spp. includ hibridizarea ADN-ului, ribotiparea, PCR etc.

Antibiograma este obligatorie in infecțiile cu tulpini de Enterococcus spp. Conform recomandărilor CLSI, se realizeaza pe mediul Mueller-Hinton, inocul 0,5 McFarland, temperatură 35°C, incubare 18 pâna la 24 ore.

Enterococii sunt în mod natural rezistenți la cefalosporine, clindamicină, trimetoprim-sulfametoxazol si față de dozele uzuale de aminoglicozide[4].

Bibliografie

(1) Andrei MA, Rugina M, Filipescu D, Bradisteanu SA. Guide for sample collecting and transport--the necessity for establishing the correct microbiological diagnosis. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol PubMed. 2004;49(3-4):175-86.

(2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(3) Gabriela Bancescu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(4) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Enterococcus spp. Lucrari practice microbiologie, anul II Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(5) Margo Baele, Paul Baele, Mario Vaneechoutte. Application of tRNA Intergenic Spacer PCR for Identification of Enterococcus species. J Clin Microbiol. 2000;38(11): 4201-4207.

(6) Richard R.Facklam, Daniel F.Sahm. Enterococcus . In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., ASM Press, 6 ed. 1995:309-14.

(7) Sylvain Brisse, Vivian Fussing, Ben Ridwan, et al. Automated Ribotyping of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2002;Vol. 40, No. 6:1977-1984.

(8) Viorel Ordeanu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

2. Infectii cu coci Gram negativi

2.1. Genul Neisseria

Clasificarea Neisseria spp. cu importanta clinica in patologia umana:

Neisseria gonorrhoeae (gonococ)

Neisseria meningitidis (meningococ)

alte Neisseria spp.

Meningococul si gonococul sunt coci Gram-negativi, reniformi (cu fețele adiacente aplatizate; aspect de boabă de cafea). Sunt dispuși în diplo, ocazional formează tetrade. Sunt imobili, înconjurați de o structură capsulară comună, sunt strict aerobi, oxidazo-pozitivi si catalazo-negativi, nu formează spori.

N. gonorrhoeae se poate găsi la nivelul mucoaselor genitale la gazdele infectate.

N. meningitidis a fost izolată la persoane sănătoase de la nivel nazal sau faringian. Portajul rinofaringian reprezintă sursa epidemică majoră si poate fi punctul de plecare al meningitei.

Afecțiuni produse

N. gonorrhoeae: la barbati, uretrita gonococică; la femei, gonoreea se localizează endocervical, dar se poate extinde la nivelul uretrei, vaginului, glandelor Bartholin, trompelor uterine cu posibilitatea apariției unor fibroze si obstrucții care conduc la sterilitate; la fetițe apare vulvovaginita; la nou nascut, oftalmia gonococică daca mama are gonoree; alte localizari sunt gonoreea ano-rectală si faringita.

N. meningitidis: meningita cerebro-spinală, septicemia, pericardita, artrita, conjunctivită[30] etc.

Factorii de virulența

N. gonorrhoeae prezinta o multitudine de factori de virulenta: lipopolizaharide (LOS), pili, proteine PorI-PorA/PorB, Opa proteine, Rmp proteine, alte proteine, proteaza IgA1, plasmide

Factorii de virulență ai N. meningitidis sunt: capsula polizaharidică, lipopolizaharide (LOS), pilii, proteine: PorA şi PorB, Opa şi Ope, alte proteine, IgA1 proteaze, plasmide.

Diagnosticul de laborator

Rezultatele investigatiilor de laborator contribuie la stabilirea unui diagnostic corect si a deciziei terapeutice[19].

Recoltarea si transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de catre medicul clinician si/sau asistent. Rezultatele investigatiilor microbiologice depind de calitatea recoltarii.

Examenul microscopic direct este esential in stabilirea unui diagnostic rapid in cazul meningitelor.

BUAP | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În sedimentul LCR se remarcă reacție inflamatorie intensă cu polimorfonucleare si perechi de coci Gram-negativi intra si perileucocitar.

In gonoree prezenta pe frotiul colorat Gram a unor perechi de coci Gram-negativi, în „boabă de cafea", intra si perileucocitari are valoare diagnostică.

Frotiul Gram nu are valoare diagnostica in faringita gonococică.

Tehnicile pentru cultivarea si identificarea bacteriei[9]

Pentru cultivarea N. gonorrhoeae şi N. meningitidis se folosesc medii selective, imbogățite (de exemplu Thayer-Martin).

Incubare la 37°C, in prezența 5-7% CO_2, cu examinare la 24, 48 şi 72 ore.

Testele uzuale pentru identificarea Neisseria spp.: testul oxidazei, testul superoxol, utilizare a zaharurilor, teste imunologice (de exemplu anticorpi monoclonali fluorescenți, coaglutinare), teste enzimatice, sisteme multitest, sonde nucleotidice ADN.

Metodele moleculare pentru detecarea N. meningitidis direct din produsele patologice au fost descrise dar inca nu sunt comercializate.

Ghidul publicat de CLSI recomanda pentru testarea sensibilității N. gonorrhoeae mediul CG suplimentat, inocul 0,5 McFarland, 36 +/- 1°C (sa nu depăşească 37°C, în prezența 5% CO2, timp 20-24 ore, pentru penicilina, cefalosporine, tetracicline, fluorochinolone.

Testarea sensibilitatii N. meningitidis prin metoda difuzimetrica este dificila, de aceea determinarea concentratiei minime inhibitorii este metoda recomandata[4].

Bibliografie

(1) Andrei MA, Rugina M, Filipescu D, Bradisteanu SA. Guide for sample collecting and transport--the necessity for establishing the correct microbiological diagnosis. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol PubMed. 2004;49(3-4):175-86.

(2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

(3) Gabriela Bancescu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008.Ref Type: Unpublished Work

(4) Joan S.Knapp, Roselyn J Rice. Neisseria and Branhamella. In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., ASM Press, 6 ed. 1995:324-240.

(5) Lansac N, Picard FJ, Menard C, et al. Novel genus -specific PCR based assays for rapid identification of Neisseria species and Neisseria meningitidis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:443-451.

(6) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Neisseria spp. Lucrari practice microbiologie, anul II Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(7) Viorel Ordeanu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(8) Warren Levinson, E Jawetz. Gram-Negative Cocci. In Medical Microbiology & Immunology.APPLETON & LANGE,USA,4 ed. 1996:81-5.

3. Infecții cu bacili Gram negativi, familia Enterobacteriaceae

3. 1. Genul Escherichia

Genul Escherichia grupează următoarele specii

Escherichia coli cu 2 biovaruri: normal si inactiv

Escherichia albertii

Escherichia blattae

Escherichia fergusonii

Escherichia hermanii

BCU ASTRA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Escherichia vulneris

Escherichia coli (colibacil) este un bacil Gram-negativ care prezintă uneori forme filamentoase. Majoritatea speciilor prezintă cili peritrichi si sunt necapsulate. Există însă tulpini de Escherichia coli imobile, unele prezentând capsulă.

Este un germen aerob, facultativ anaerob care poate avea deopotrivă metabolism fermentativ sau respirator.

Afecțiuni provocate:

Gastroenterite produse de E.coli enterotoxigenic (ETEC), E.coli enteroinvasive (EIEC), E.coli enteropatogen (EPEC), E.coli enterohemoragic (EHEC), E.coli enteroagregativ (EaggEC), E.coli difuz aderent (DAEC).

Alte infecții: infecții de tract urinar, bacteriemie, meningită neonatală, șoc endotoxinic, infecții nozocomiale.

Factorii de virulența

E. coli exprima o multime de factori de virulenta: invazine, adezine, toxine, factori cu rol antifagocitar, factori protectori la reacția bactericidă a serului, factori protectori față de răspunsul imun, factori genetici ai patogenității, flageli etc

Diagnosticul de laborator

Rezultatele investigațiilor de laborator contribuie la stabilirea unui diagnostic corect și a deciziei terapeutice.

Recoltarea si transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de catre medicul clinician si/sau asistent. Rezultatele investigațiilor microbiologice depind de calitatea recoltarii[2].

Tehnicile pentru cultivarea si identificarea bacteriei[13]

Diagnosticul de laborator este bacteriologic si se bazează pe identificarea tulpinilor de Escherichia coli în variate produsele patologice: sânge, urină, materii fecale, bilă, puroi, exsudate, lichid cefalo-rahidian, alimente, vărsături.

Produsele patologice se însămânțeză pe medii pentru enterobacterii.

Identificarea pe baza caracterelor biochimice (teste TSI, MILF, folosirea citratului; teste API 20 E; analizoare automate de identificare) se completează cu serotipia pentru tulpinile izolate în coprocultură.

Prin metodele de biologie moleculara se pot identifica diferite tulpini de E. coli.

Antibiograma este obligatorie in infecțiile cu tulpini de Escherichia coli.

Conform recomandărilor OMS/CLSI, se realizeaza pe mediul Mueller-Hinton, inocul 0,5 McFarland, temperatură 35°C, incubare 16 pana la 18 ore.

Tulpinile de E.coli care produc betalactamaze cu spectru extins pot fi rezistente la terapia cu peniciline, cefalosporine sau aztreonam, deşi *in vitro* sunt sensibile la unul dintre aceste antibiotice, de aceea testul screening este urmat de testul fenotipic de confirmare.

Bibliografie

(1) Alain L.Servin. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews. 2005;Vol. 18, No. 2:264-292.

(2) Andrei MA, Rugina M, Filipescu D, Bradisteanu SA. Guide for sample collecting and transport--the necessity for establishing the correct microbiological diagnosis. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol PubMed. 2004;49(3-4):175-86.

(3) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

(4) Eva M.Nielsen, Marianne Thorup Andersen. Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli by Automated 5' Nuclease PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology. 2003;Vol. 41, No. 7:2884-2893.

(5) Gabriela Bancescu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

BUAS/ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(6) James R.Johnson, Adam L.Stell. PCR for Specific Detection of H7 Flagellar Variant of fliC among Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. Journal of Clinical Microbiology. 2001;3712-3717-Vol. 39, No. 10.

(7) Larry D.Gray. Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia. In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., ASM Press, 6 ed. 1995:450-6.

(8) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Escherichia coli. Lucrari practice microbiologie, anul II Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(9) Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 1998;11:142-201.

(10) Viorel Ordeanu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(11) Warren Levinson, E Jawetz. Gram-Negative Rods related to the Enteric Tract. In Medical Microbiology & Immunology.APPLETON & LANGE,USA,4 ed. 1996:94-112.

3. 2. Genul Klebsiella

Genul Klebsiella grupează următoarele specii:

Klebsiella granulomatis
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae
Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae
Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis
Raoultella ornithinolytica
Raoultella planticola
Raoultella terrigena

Sunt bacili nesporulați, neciliați, Gram-negativi, scurți și grosi, cu capete rotunjite, dispuși în diplo. În produsele patologice apar sub formă de cocobacili, înconjurați de capsulă. Sunt germeni aerobi, facultativ anaerobi.

Afecțiuni produse

Pneumonie, infecții de tract urinar, infecții de plagă, peritonită, bacteriemie, meningită, infecții nozocomiale[1] etc.

Factorii de virulența

Virulența Klebsiella spp. este legată de capsulă, fimbrii, pili sexuali, enterotoxina.

Diagnosticul de laborator

Rezultatele investigațiilor de laborator contribuie la stabilirea unui diagnostic corect și a deciziei terapeutice.

Recoltarea si transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de catre medicul clinician si/sau asistent. Rezultatele investigațiilor microbiologice depind de calitatea recoltarii[1].

Tehnicile pentru cultivarea si identificarea bacteriei.

Diagnosticul de laborator este bacteriologic si se bazează pe identificarea tulpinilor de Klebsiella spp în variate produsele patologice: spută, sânge, urină, puroi etc.

Prelevatele se însămânțeză pe medii selective si neselective in poligon deschis pentru a obține colonii microbiene izolate

Identificarea pe baza caracterelor biochimice (teste TSI, MILF, folosirea citratului; teste API 20 E; analizoare automate de identificare)se completează cu tiparea serologică realizând reacții de aglutinare, coaglutinare sau latex-aglutinare cu seruri anti-K.

Metodele de biologie moleculara sunt folosite în identificarea Klebsiella spp.

Antibiograma este obligatorie in infecțiile cu tulpini de Klebsiella spp.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conform recomandărilor OMS/CLSI, se realizeaza pe mediul agar Mueller-Hinton, inocul 0,5 McFarland, temperatură 35°C, incubare 16 pana la 18 ore.

Tulpinile de Klebsiella spp. care produc betalactamaze cu spectru extins pot fi rezistente la terapia cu peniciline, cefalosporine sau aztreonam deşi in vitro sunt sensibile la unul dintre aceste antibiotice, de aceea testul screening este urmat de testul fenotipic de confirmare[2].

Bibliografie

(1) Andrei MA, Rugina M, Filipescu D, Bradisteanu SA. Guide for sample collecting and transport--the necessity for establishing the correct microbiological diagnosis. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol PubMed. 2004;49(3-4):175-86.

(2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

(3) Gabriela Bancescu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(4) J.K.Onokodi, G Wauters. Capsular Typing of Klebsiellae by Coagglutination and Latex Agglutination. Journal of Clinical Microbiology. 1981;vol 13, no. 4:609-612.

(5) Kuo-Ming Yeh, A.Kurup, L.K.Siu, et al. Capsular Serotype K1 or K2, Rather than magA and rmpA, Is a Major Virulence Determinant for Klebsiella pneumoniae Liver Abscess in Singapore and Taiwan. Journal of Clinical Microbiology. 2007;Vol. 45, No. 2:466-471.

(6) Laure Diancourt, Virginie Passet, Jan Verhoef. Multilocus Sequence Typing of Klebsiella pneumoniae Nosocomial Isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2005;Vol. 43, No. 8:4178-4182.

(7) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Klebsiella spp. Lucrari practice , anul II Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(8) Mary J.R.Gilchrist. Enterobacteriaceae: Opportunistic Pathogens and Other Genera. In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., ASM Press, 6 ed. 1995:457-64.

(9) Viorel Ordeanu. Note de curs. anul II, Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(10) Warren Levinson, E Jawetz. Gram-Negative Rods related to the Enteric Tract. In Medical Microbiology & Immunology.APPLETON & LANGE,USA,4 ed. 1996:94-112.

4. Infecții cu bacili Gram negativi non-enterobacteriaceae

4.1. Genul Pseudomonas

Identitatea biologica a genului Pseudomonas s-a schimbat dramatic in ultimii ani, (tabelul nr.1) datorita trecerii de la clasificarea bazata pe omologia ARN-ului, la reclasificarea pe baza proprietatilor genotipice (filogenetice), ilustrata in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology".

Tabelul nr.1 Nomenclatura grupului Pseudomonas

ARN	Pseudomonas spp. (vechea clasificare)
I	P. aeruginosa, P. fluorescens (cateva biotipuri), P. putida, P. chlororaphis, P. syringae, P. cichorii, P. stutzeri, P. mendocina, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes, P. agarici, P. angulata, P. fragi, P. synxantha, P. taetrolens,

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

	P. mucidolens, P. oleovorans, P. resinovorans
II	P. cepacia, P. gladioli, P. caryophylli, P. pseudomallei, P. mallei, P. solanacearum, P. pickettii, P. pyrrocinia, P. andropogonis
III	P. (Comamonas) acidovorans, P. (Comamonas) testosteroni, P. saccharophila, P. facilis, P. delafieldii, P. alboprecipitans, P. palleronii
IV	P. diminuta, P. vesicularis
V	Xanthomonas maltophilia

Noua clasificare se refera la urmatoarele modificari:

- organismele din grupul II fiind suficient de diferite de cele din grupul I constituie genul Burcholderia, din care fac parte urmatoarele specii: B.cepacia, B.mallei, B.pseudomallei, B.picketti, B.gladioli, B. caryophylli si B.solanacearum.
- organismele din grupul III sunt clasificate intr-o noua familie Comamonadaceae, care include genurile Comamonas si Acidivorax.

desi organismele din grupul IV prezinta semnificative diferente genetice fata de grupul I apartin genului Pseudomonas.

- Xanthomonas maltophilia a fost atribuit genului Stenotrophomonas.

Pseudomonas aeruginosa este un bacil fin, Gram negativ, dispus izolat, în perechi sau lanțuri scurte, nesporulat, prezentând un cil polar care îi conferă mobilitate.

Afecțiuni produse

Pseudomonas aeruginosa (bacilul piocianic) este agent etiologic al infectiilor cu diverse localizari ca pneumonia, infectiile de tract urinar, bacteriemia, endocardita, sistem musculoscheletal, ochi, urechi, sistem nervos central.

Factorii de virulența

Pseudomonas aeruginosa produce o serie de factori de virulență: pili, alginat, neuraminidaza, lipopolizaharid, exotoxina A, enterotoxină, exoenzima S, fosfolipaza C, elastaze, leukocidină, piocianine.

Diagnosticul de laborator

Rezultatele investigațiilor de laborator contribuie la stabilirea unui diagnostic corect şi a deciziei terapeutice[6].

Recoltarea si transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de catre medicul clinician si/sau asistent. Rezultatele investigațiilor microbiologice depind de calitatea recoltarii.

Examenul microscopic direct evidentiaza bacili Gram-negativi drepți sau uşor încurbați aşezați izolat, în perechi sau scurte lanțuri, intra si perileucocitar.

Tehnicile pentru cultivarea si identificarea bacteriei.

Pentru izolarea Pseudomonas spp. din produsele patologice cu flora mixta se folosec medii selective; însamantarea produselor patologice se face in poligon deschis cu scopul obtinerii coloniilor microbiene izolate; incubare aerobă la 37°C, 18 – 24 ore.

Capacitatea Ps. aeruginosa de a creste la 42°C il diferentiaza de Ps. fluorescens si Ps. putida.

Identificarea pe baza caracterelor de cultură, biochimice: prezența de pigment, mirosul caracteristic, oxidaza pozitivă.

Sistemele de identificare a bacililor Gram-negativi non-fermentativi, prezinta o acuratețe mai mare de 90%, atât in cazul kiturilor manuale: API 20NE, IDTri-Panel sau analizoare automate: PDPhoenix, Vitek

Tehnicile moleculare se folosesc în controlul epidemiologic al infecțiilor.

BCU ASI CENTRALA UNIVERSITARA

Antibiograma este obligatorie in infecțiile cu tulpini de Pseudomonas aeruginosa. Conform recomandărilor OMS/CLSI, se realizeaza pe mediul Mueller-Hinton, inocul 0,5 McFarland, temperatură 35°C, incubare 16 pana la 18 ore.

Pseudomanas aeruginosa dezvoltă rezistența în timpul terapiei prelungite cu antibiotice; unele izolate, inițial sensibile au dezvoltat rezistența dupa trei - patru zile de tratament, de aceea se recomandă testări repetate.

Bibliografie

(1) Ajello GW, A.W.Hoadley. Fluorescent pseudomonads capable of groth at 41grade but distinct from Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. 1976;4:443-449.

(2) Andrei MA, Rugina M, Filipescu D, Bradisteanu SA. Guide for sample collecting and transport--the necessity for establishing the correct microbiological diagnosis. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol PubMed. 2004;49(3-4):175-86.

(3) Barbara H.Iglewski. Pseudomonas. In: Samuel Baron, ed. Medical Microbiology. 4th ed. 2003.

(4) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

(5) George M.Garrity, Julia A.Bell, Timothy G.Lilburn. Taxonomic outline of the Prokariotes.Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2004.

(6) Manuela Anda Andrei. Etapele diagnosticului de laborator in infectiile cu Pseudomonas aeruginosa. Lucrari practice , anul II Facultatea de Farmacie. 2008. Ref Type: Unpublished Work

(7) Palleroni NJ. Family Pseudomonadaceae. In: Kreig NR, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1984:141-219.

(8) Peter H.Gilligan. Pseudomonas and Burkholderia. In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., ASM Press, 6 ed. 1995:509-19.

(9) Pholawat Tingpej, Lucas Smith, Barbara Rose, et al. Phenotypic Characterization of Clonal and Nonclonal Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Lungs of Adults with Cystic Fibrosis. Journal of Clinical Microbiology. 2007;Vol. 45, No. 6:1697-1704.

(10) Speert DP. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa. Front Biosci. 2002;7:e354-e361.

5. Dificultați la testarea sensibilitații bacteriilor cu înaltă rezistență la antibiotice

Eşecul testării prin metoda difuzimetrică sau determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) a tulpinilor de E.coli si Klebsiella pneumoniae care produc betalactamaze cu spectru extins (BLSE) este bine documentat.

Turner si colaboratorii, într-un studiu extins, au raportat că doar doua din 130 laboratoare au precizat corect bacteriile care produc BLSE prin metoda difuzimetrică. Diferențe in capacitatea de testare au apărut şi în cazul determinării CMI cu ajutorul analizoarelor automate, astfel, doar 35% din laboratoarele care folosesc sistemul Vitek au raportat tulpina de Klebsiella pneumoniae rezistentă la ceftazidim şi ceftriaxon, în schimb laboratoarele care au determinat rezistența cu ajutorul Microscan-ului au raportat intr-un procent de 100% rezistența la aceaşi tulpină.

O metodă moleculară folosită astăzi pentru detectarea prezenței betalactamazei este PCR-ul care foloseşte ca primeri oligonucleotide specifice, fără a discrimina însă diferitele variante de TEM şi SHV.

Ouellette et al. au dezvoltat metoda oligotipării care permite diferențierea între TEM-1 şi TEM-2[11]. Mabilat si Courvalin au dezvoltat oligonucleotide care permit detectarea mutațiilor

BCU "I.C. BRĂTIANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în şase poziţii ale genei bla_{TEM}[8], metoda cu ajutorul careia au fost identificate noi variante de TEM în izolatele clinice.

Asocierea PCR-SSCP cu PCR-RFLP a permis identificarea a 17 diferite gene SHV.

Prezenta genelor de tip OXA în izolatele clinice în care s-a identificat Ps. aeruginosa a fost prima dată detectată cu ajutorul tehnicii hibridizării, metodă care insa nu poate să distingă între betalactamazele de tip OXA care produc BLSE de cele care nu produc BLSE. Secvenţa nucleotidelor ramâne standardul pentru determinarea prezenţei genelor specifice betalactamazelor.

Dificultati in testarea rezistentei bacililor Gram negativi la imipenem si meropenem.

În raportarea organismelor care au CMI apropiată de break-points-ul carbapenemelor pot să apara erori, de exemplu izolatele de Pseudomonas aeruginosa au adesea valoarea CMI apropiată de valoarea Intermediar (8 µg/ml) sau Rezistent (≥16 µg/ml), unele specii ca Proteus mirabilis, P. vulgaris si Morganella morganii, adesea au CMI (1-4 µg/ml) imediat sub valoarea Intermediar pentru carbapenemi (8 mg/ml).

Metoda microdiluţiei poate detecta rezistenţa la carbapenemi daca este corect executata, cu toate acestea false rezisteţe au fost raportate la imipenem în cazul folosirii preparatelor comerciale datorita degradarii antibioticului sau concentraţiei prea mici în panel.

Meropenemul poate sa fie mai stabil decât imipenemul, cu toate acestea condţtiile de stocare ale panelurilor, cardurilor şi discurilor trebuie sa se monitorizeze permanent şi controlul de calitate se efectueaza frecvent.

Tulpinile rezistente sau intermediare la carbapenemi se testează printr-o metodă alternativă, de exemplu E-test.

Dificultaţi în testarea rezistenţei Enterococcus spp.

Rezistenţa enterococilor la penicilină şi ampicilină nu poata fi detectată prin metoda difuzimetrică, metoda diluţiei (inoculul este prea scăzut), de aceea se recomanda testul nitrocefin-betalactamază pentru enterococii izolaţi din hemocultura şi LCR.

E. faecium este cea mai frecventa specie izolata cu rezistenţă la vancomicina (CMI>128 µg/ml) si teicoplanin (CMI≥16 µg/ml), izolate care contin gena vanA.

Izolatele van-B produc un nivel scăzut al rezistenţei la vancomicină (CMI 16 pînă la 64 µg/ml) şi sunt sensibile la teicoplanin (CMI≤1 µg/ml).

Câteva tulpini de E. faecium van-D au prezentat un nivel moderat al rezistenţei la vancomicină (CMI 64 până 128 µg/ml) şi teicoplanin (CMI 4-8 µg/ml).

E gallinarum si E. casseliflavus/E. flavescens sunt intrinsec rezistente la vancomicină (CMI 2 până la 16 µg/ml) şi au prezentă gena vanC.

Identificarea la nivel de specie este obligatorie deoarece confirmă daca o tulpină prezintă rezistenţă intrinsecă (vanC) sau rezistentă dobandită (vanA ori vanB) la vancomicină.

Cunoaşterea tipului de rezistenţa are un rol esenţial în controlul infecţiilor, genele vanA şi vanB sunt transferabile şi se pot răspândi de la un organism la altul, în schimb vanC nu sunt transferabile şi nu sunt asociate cu infecţii grave.

Screeningul la vancomicina se determină prin inocularea coloniilor obţinute în cultură pură îintr-o suspensie de BHIA (brain heart infusion agar plate) care conţine 6 µg/ml vancomicină. În cazul observarii unui diametru de 15-16 mm, tulpina trebuie testată prin determinarea CMI-ului.

Se repetă identificarea, pentru a elimina organismele tipic rezistente la vancomicină: Leuconostoc spp., Pediococcus spp., Lactobacillus spp.

Standardul CLSI recomandă testarea mobilitiaţii şi producerii de pigment pentru a diferenţia speciile care dobandesc rezistenţa vanA şi van B de cele cu rezistentă intrinsecă vanC.[5].

Rezistenţa la aminoglicozide se testează numai pentru gentamicină (conţinutul discului 120 micrograme) şi streptomicină (conţinutul discului 330 micrograme).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sinergia între ampicilină, penicilină sau vancomicină şi un aminoglicozid poate fi prezisă pentru enterococi folosind testul screening pentru a determina înalta rezistentă (HLAR).

În cazul unui diametru de 7-9 mm (pentru gentamicină şi streptomicină), testul este neconcludent şi se recomandă o metodă alternativă de testare.

Dificultaţi în testarea rezistenţei MRSA (staphylococcus aureus meticilino-resistent), GISA/VISA (staphylococcus aureus cu „sensibilitate" intermediară la vancomicină)

„The National Committee for Clinical Laboratoty Standards" (NCCLS) recomanda pentru testarea MRSA, urmatoarele: metoda difuzimetrica, testul screening pentru rezistenta la oxacilină a S. aureus,determinarea concentratiei minime inhibitorii[9].

Interpretarea rezultatelor este diferita pentru S.aureus de Stafilococii coagulazo-negativi.

Microbiologul trebuie sa fie avizat ca Stafilococii meticilino-rezistenti sunt adesea rezistenţi la multiple clase de antibiotice: aminoglicozide, clindamicin, macrolide, chinolone, sulfonamide, tetracicline etc.

Scăderea rezistenţei la Vancomicină a S. aureus este dificil de detectat în laborator, pentru ca metoda difuzimetrică nu diferenţiaza tulpinile sensibile la vancomincină, de cele rezistente sau intermediare la vancomocină.

Toţi stafilococii cu diametrul $\leq$ 14 mm trebuie testaţi prin determinarea CMI.

Posibilitaţi actuale în testarea VISA: "Vancomicyn screening plates".

Laboratorul de microbiologie trebuie sa fie capabil sa detecteze organismele rezistente, aparitia noilor mecanisme de rezistenta, sa diferentieze intre o falsa rezistenta aparuta datorita erorilor tehnice si aparitia unui mecanism nou de rezistenta. Rezultatele eronate duc la esecul tratamentului pacientului si monitorizare incorecta a infectiilor.

Bibliografie

(1) Bradford PA. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of bla_{SHV} genes. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2960-2963.

(2) Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Detection of Imipenem or Meropenem Resistance in Gram-negative Organisms. Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP) . 1999. Ref Type: Internet Communication

(3) Chanawong A, F.H.M'Zali, J.Heritage, et al. Characterization of extended-spectrum -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). FEMS Microbiol Lett. 2000;184:85-89.

(4) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2008.

(5) CLSI (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 2005.

(6) Emery CL, L.A.Weymouth. Detection and clinical significance of extended-spectrum -lactamases in a tertiary-care medical center. J Clin Microbiol. 1997;35:2061-2067.

(7) Jacoby GA, P.Han. Detection of extended-spectrum -lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. J Clin Microbiol. 1996;34:908-911.

(8) Mabilat C, and P.Courvalin. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34:2210-2216.

(9) NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 2002.

(10) NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 2003.

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

(11) Ouellette M, G.C.Paul, A.M.Philippon, and P.H.Roy. Oligonucleotide probes (TEM-1, OXA-1) versus isoelectric focusing in -lactamase characterization of 114resistant strains. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32:397-399.

(12) Steward CD, S D.Wallace, S.K.Hubert, et al. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of Project ICARE laboratories. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;38:59-67.

(13) Tenover FC, M.J.Mohammed, J.Stelling, et al. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: proficiency testing and quality control results from the World Health Organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2001; 39:241-250.

(14) Vahaboglu H, R.Ozturk, H.Akbal, et al. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum -lactamases. J Clin Microbiol 36:827-829. 1998;36:827-829.

(15) White RL, M.B.Kays, L.V.Friedrich, et al. Pseudoresistance of Pseudomonas aeruginosa resulting from degradation of imipenem in an automated susceptibility testing system with predried panels. Journal of Clinical Microbiology. 1991;29:398-400.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 2

EFECTE ALE MEDICAMENTELOR LA NIVELUL MEMBRANELOR BACTERIENE

Cercetarea biomedicala de medicamente noi cu actiune antibacteriana traverseaza in prezent o criza majora, datorita instalarii rezistentei la antibiotice si chimioterapice pe de o parte si datorita lipsei de „idei noi" in ceea ce priveste mecanisme de actiune si deci clase noi de compusi activi. Organizatia Mondiala a Sanatatii a definit cu ocazia Congresului al 3–lea Mondial de Stiinte Farmaceutice de la Amsterdam, in aprilie 2007, **problema terapiei infectiilor ca prima problema a omenirii la capitolul cercetarea medicamentului**, inainte de problema medicamentelor pentru bolile cardiovasculare si a celor pentru cancer. Din acest motiv, in cele ce urmeaza sunt prezentate unele mecanisme „biofizice „de actiune a medicamentelor la nivelul membranelor celulare, inclusiv la nivelul membranei bacteriene, care ar putea fi folosite ca puncte de plecare pentru cercetarea de noi medicamente cu actiune la acest nivel.

1. Efecte asupra potențialului electroforetic al bacteriilor

Potențialul electroforetic al bacteriilor este dat, pe de o parte, de sarcinile datorate disocierii acizilor din compoziția membranei şi pe de altă parte, de sarcinile adsorbite la interfetele membranare.

Densitatea superficială de sarcină dată de sarcinile adsorbite la o interfata oarecare, dupa cum este calculata in monografiile standard de chimie fizica, poate fi aproximată de formula:

$$\sigma = \alpha\sqrt{c}\sinh\beta\zeta$$

unde α şi β sunt constante, c — concentrația electrolitului în mediul adiacent membranei şi ζ — potențialul la suprafața membranei. Când concentrația de electrolit (sau mai exact tăria ionică a mediului) nu este prea mare, căderea de potențial este aproape toată în stratul dublu difuz şi deci ζ se poate identifica cu potențialul electroforetic măsurat experimental.

Măsurătorile asupra potențialului electroforetic la Streptococcus faecalis şi Escherichia coli[1] au arătat ca acesta depinde de pH, ceea ce s-a interpretat ca fiind o urmare a influenței ionilor de hidrogeni liberi in solutie asupra disocierii gruparilor

-COOH din membrană. In interfață, de fapt, pH-ul este mai mic decat in restul soluției, câmpul electric favorizând ionizarea (ζ este negativ):

$$\left[H^+\right]_{suprafata} = \left[H^+\right]_{solutie} + \frac{\varepsilon\zeta}{2.3kT}$$

unde ε este constanta dielectrică a soluției.

Deci sarcinile din interfață provin, atât din adsorbție, cât si din disocierea moleculelor membranei.

Experimental s-a constatat ca o scadere a mobilitatii electroforetice scade cu creşterea tăriei ionice, în contradicție cu formula de mai sus, ceea ce reprezintă un indiciu de comportare critică. Comportarea critica s-ar putea datora „compactarii"stratului dublu difuz o data cu cresterea tariei ionice a solutiei.

In aceleaşi condiții, prezența bromurii de cetiltrimetilamoniu[2], moleculă încărcată pozitiv, scade mobilitatea electroforetică a bacteriilor producându-se, la concentrații mai mari chiar o inversare a potențialului. De menționat că, la concentrațiile în care aceasta se foloseşte în

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

practică, reducerea potențialului este de 10—30%, ceea ce presupune că mai există şi un alt mecanism de acțiune bactericidă în acest caz.

Modificarea potențialului electric al interfețelor de către medicamente

Potențialul interfeței lipide – mediu apos este dat de sarcinile şi dipolii din interfață precum şi de sarcinile şi dipolii din mediul a cărui frontieră este interfața respectivă şi în care se formează stratul dublu electric ce vine să compenseze încărcarea interfeței:

$$\Delta V = \frac{4\pi n\mu}{D} + \Psi_0$$

unde n — densitatea dipolilor în interfață, D — constanta dielectrică a mediului, μ— dipolmomentul şi Ψ_0 — potențialul de suprafață.

Faptul că la nivelul membranei permeabilitatea față de ioni este controlată de potențialul transmembranar, iar acesta la rândul lui este determinat de distribuția şi orientarea sarcinilor şi dipolilor în membrană , nu este o idee noua fiind de fapt o ipoteza implicită a modelului Hodgkin—Huxley privind aparitia si propagarea potențialul de acțiune.

In cazul monostraturilor mixte conținând lecitină şi colesterol[3] în care apar mai mulți dipoli, se respectă, mai puțin regula aditivității ariilor în diagramele presiune superficială — arie moleculară. In schimb este bine respectată regula aditivității potențialelor. Potențialul interfeței s-a găsit că este proporțional cu concentratia moleculelor cu moment de dipol:

$$\Delta V = kn\mu$$

Adăugarea unor substanțe amfifile poate duce la oscilații ale tensiunii interfaciale şi ale potențialului, cum de exemplu avem interfața apă—butanol[4], „autooscilații" care, apar şi in vivo, la unele celule.

Intr-un strat insolubil de gliadină — (proteină din peretele bacteriilor), în contact cu o soluție de săruri cuaternare de amoniu, bactericide, potențialul scade foarte rapid în primele 15 minute[5] pentru ca apoi să rămână constant. Din acest fapt precum şi din analiza diagramei presiune superficială — concentrație, s-a emis ipoteza că se produce întâi o ancorare a sării de amoniu prin intermediul unei legături ionice între ionul amoniu şi grupări negative din proteină, după care moleculele se reorientează formându-se o legătură mai puternică, hidrofobă.

Un model complex din film mixt lipid anionic - coloid cationic, conținând bromură de poli-(2-metil-5-vinil-hexilpiridiniu) (PMVP) şi fosfatidil inozitolmonofosfat, s-a utilizat ca model de membrană care să simuleze atât stabilitatea membranei ca dispersie coloidală de proteine în lipide, cât şi influența unor medicamente asupra potențialului de membrană la nivelul axonului gigant[6].

S-a găsit că potențialul de suprafață Φ^s la presiunea de expansiune de la lichid condensat la lichid expandat a filmului de PMVP, depinde liniar de fracția de concentrație a componentelor. Când fracția este de 0,5 (deci componenta negativă şi cea pozitivă sunt în concentrații egale), încărcarea electrică a stratului este nulă.

S-a făcut un paralelism între aceste efecte şi acțiunea ionului de Ca asupra potențialului de membrană, când particulele deplasate se distribuie între două stări — închis şi deschis, în funcție de potențialul de membrană[7].

2. Efecte de modificare a tensiunii interfaciale

2.1. Efecte *in vitro*

2.1.1. Starea interfacială şi absorbția la interfețe

Materia, la frontiera între două faze are proprietăți ce o diferențiază de cea aflată în fiecare din cele două faze continue în contact. Din punct de vedere macroscopic ea reprezintă, o

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

suprafață sau zonă critică, la traversarea acestei suprafețe proprietățile macroscopice cunoscând o discontinuitate, un salt mare pe o distanță microscopică. La acest nivel o parte din mărimile ce descriu fazele macroscopice își pierd sensul.

In sistemele în care raportul dintre suprafață şi volum este foarte mare (şi în această categorie intră toate sistemele coloidale) apar fenomene noi legate de aceste interfețe care determină proprietăți globale ce individualizează aceste sisteme.

Cel mai semnificativ caz este cel al soluțiilor de substanțe tensioactive (şi acesta este cazul aproape al tuturor medicamentelor) la care atunci când se atinge concentrația micelară critică tensiunea superficială, presiunea osmotică, conductivitatea, capacitatea de spălare etc. cunosc salturi foarte mari. Concentrația micelară critică semnifică în cele mai multe cazuri trecerea sistemului din starea de dispersie moleculară în cea de soluție coloidală, solutie in care avem molecule libere si asociatii ale acestora.

Energia liberă a acestor sisteme este foarte mare şi de aici tendința naturală este ca ele să evolueze spre o stare în care interfața să fie minimă si care se realizeaza prin"coagularea" micelelor si a picaturilor de lipide. Această stare pentru sistemele vii înseamnă de fapt dezorganizare şi moarte şi de aceea se cheltuieşte în permanent o energie pentru împiedicarea acestei evoluții.

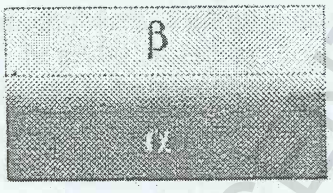
Efectul adsorbției asupra tensiunii interfaciale

O moleculă în interfață este supusă acțiunii moleculelor vecine dar, datorită distribuției asimetrice a acestora, rezultanta totală a interacțiunilor nu mai este nulă ca pentru o moleculă din interiorul fazei.

Această rezultantă va fi orientată de exemplu, la interfața lichid gaz către interior şi lichidul se comportă ca şi cum ar fi închis într-o membrană elastică. Interfața este de fapt o interfază neizotropă de o grosime nedefinită. O metodă de calcul a proprietăților acestei faze constă în înlocuirea sistemului real cu unul ideal format din două faze omogene (fig. 1).

In această interfață se vor regăsi componentele din cele două faze, dar în alte concentrații. In locul acestor concentrații Gibbs a introdus „excesul superficial" definit ca excesul de molecule de un anumit tip pe unitatea de suprafață.

Fig. 1. Apariția tensiunii interfaciale datorită asimetriei distributiei moleculelor



Modelul simplificat al interfeței

Energia superficială se va defini în acest caz ca diferența între energia totală a sistemului şi energiile celor două faze:

$$Es = E - (E_\alpha + E\beta)$$

Expresia cea mai simplă pentru excesul superficial este cea pentru cazul unui singur component dizolvat într-un solvent, făcând o serie de ipoteze simplificatoare:

$$\Gamma = -\frac{d\sigma}{d\mu} = -\frac{c}{RT}\frac{d\sigma}{dc} = -\frac{1}{RT}\frac{d\sigma}{d(\ln c)}$$

unde Γ este excesul superficial de solvat, б tensiunea, superficială a soluției, μ potențialul chimic şi c concentrația solvatului. O interfață de acest tip este suprafața alveolelor pulmonare, la care avem un exces de substanțe tensioactive cu funcție fiziologică.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Formula furnizează şi o metodă de determinare experimentală a excesului superficial: studiul dependenţei tensiunii superficiale de concentraţia solvatului.

La interfeţele tip solid - lichid, cum avem de exemplu interfeţele macromolecule - plasmă, proteine membranare - mediu extracelular valve mitrale sau proteze vasculare - plasmă, proteine - lipide în membrană etc., dat fiind că medicamentul se află întotdeauna în concentraţii mici, în prima fază se poate aproxima că adsorbţia este proporţională cu concentraţia:

$$Q = kc$$

Dacă însă substanţa medicamentoasă are tendinţa de a se acumula la interfaţă (cazul substanţelor amfipatice) la un moment dat se poate ca la suprafaţă „locurile disponibile" să se diminueze şi, ca urmare, procesul să sufere o încetinire până la oprirea lui ajungându-se la „o valoare de saturaţie a adsorbţiei".

Procesul decurge ca un echilibru între adsorbţie şi desorbţie, adsorbţia proporţională cu numărul de locuri libere şi desorbţia cu numărul de locuri ocupate:

$$\Gamma = k_a(\Gamma_\infty - \Gamma)c - k_d\Gamma$$

unde Γ notează numărul de locuri ocupate, $\Gamma\infty$ numărul total de locuri disponibile, c — concentraţia medicamentului, k_a şi k_d — constante. Aceeaşi tratare se prezintă de multe ori ca o interacţiune între medicament şi „receptorii" de la nivelul membranei. Un astfel de model este aplicat[9] la modelarea instalării în timp a efectului blocant al potenţialului de acţiune la nervul sciatic de broască de către lidocaină.

S-au studiat[10] interacţiunile unor săruri cuaternare de amoniu bactericide cu monostraturi de gliadină (proteina principală din peretele bacteriilor Gram-negative) şi cefalină (fosfolipid cu multe grupări acid şi, în consecinţă, încărcat negativ) care apar în compoziţia aceloraşi membrane.

Faptul că la filmele de gliadină se modifică şi presiunea interfacială şi potenţialul transinterfacial pledează pentru ideia de pătrundere şi pentru cea de ancorare la presiuni mici şi adsorbţie prin legătura hidrofobă la presiuni mari, când probabil radicalul alchil al substanţei bactericide se leagă de proteină.

La filmele de gliadină — cefalină, ce vin să simuleze peretele bacteriilor Gram negative, nu mai apare asocierea, sarea cuaternară de amoniu fiind exclusă la presiuni mari, rămânând totuşi ancorată de cefalină. Deci cefalină ar fi cea care conferă protecţie bacteriilor Gram-negative faţă de substanţele bactericide din grupul sărurilor cuaternare de amoniu. Adăugarea de protamină — încărcată pozitiv — care interacţionează cu cefalina, înlătură această protecţie.

Asocierea cefalină - sare cuaternară de amoniu este sugerată şi de faptul că o soluţie în care sunt amândouă prezente are o conductivitate electrică mai mică decât soluţiile care conţin numai una din cele două componente.

Adsorbţia unor proteine în stratul de lipide duce la formarea de „canale" prin care este posibil un transport mai rapid al ionilor. Astfel gramicidina, polipeptid format din 15 aminoacizi poate forma un dimer care să se constituie într-un canal ionic ce se închide şi deschide aleator.

„Dimerizarea" nu este de fapt o reacţie chimică, ci numai o asociere întie două molecule datorită dipolilor permanenţi din compoziţia lor şi în special nucleul indolic al triptofanului, cu un moment de 2,3 Debye.

BCU MEDICINA / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Incorporarea unor gramicidine semisintetice cu un număr variabil de unități de triptofan în straturi de glicerol monooleat arată o creştere a transportului ionic prin membrana artificială astfel creată o dată cu creşterea numărului de dipoli de triptofan[11].

3. Efecte asupra transportului prin membrane de bistraturi lipidice (BOL)

3.1. Transportul prin bistraturi lipidice plane

Bistraturile plane lipidice s-au dovedit în timp drept modele acceptabile pentru studiul mecanismelor de transfer al ionilor prin membrane prin aceea că la nivelul lor se poate produce şi un transfer de „ioni hidrofobi" prin faza lipidică, precum şi un transfer prin canale formate cu ajutorul unor antibiotice.

3.1.1. Antibiotice „transportori" de ioni

Mai multe antibiotice ciclice, de tipul valinomycinei[12] sau tetralide macrociclice (monactina, nonactina etc.) se comportă ca transportori ai cationilor alcalini prin membranele bilipidice.

Transportul este similar cu solubilizarea substanțelor medicamentoase prin includerea lor în micele de către substanțele tensioactive. De această dată sunt „solubilizați" ionii în zona interfacială prin includere în interiorul moleculei de antibiotic şi facilitat astfel transferul lor prin faza lipidică (fig. 3).

Efectul este neaşteptat nu prin natura lui, ci prin saltul uriaş în permeabilitatea bistraturilor lipidice față de respectivii ioni. Astfel se obțin creşteri de circa 5 ordine de mărime. Tot remarcabil este faptul ca prin aceste efecte creşte[13] permeabilitatea față de ionii respectivi la nivelele constatate *in vivo* şi la concentrații de antibiotice de ordinul celor ce se obțin în mod obişnuit în plasma pacienților în practica clinică.

In cazul valinomicinei apare chiar şi o „selectivitate"[12], permeabilitatea față de K^+ fiind de circa 300 de ori mai mare decât cea față de Na^+.

Studiul cu raze X al structurii complecşilor antibiotic - ion[14] a sugerat o structură aproximativ sferică, atomii de oxigen fiind orientați în spre centrii unde este inclus cationul, după cum este reprezentată schematic în fig. 2.

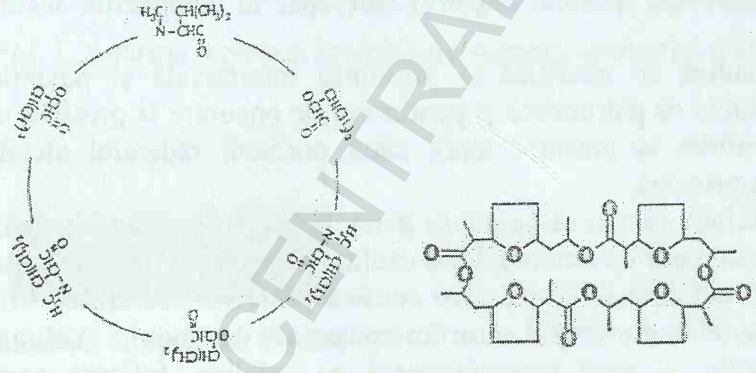


Fig. 2. — Structura moleculelor de nonactină şi eniantină B

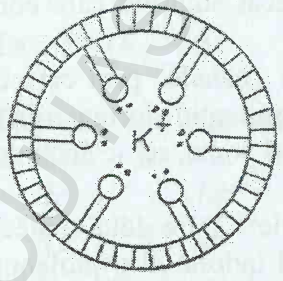


Fig. 3. — Reprezentarea schematică a complexului antibiotic — ion

3.1.2. Antibiotice formatoare de canale

Mergând mai departe cu analogia făcută intre transportul mediat de antibiotice şi solubilizare, vom considera un alt tip de micele de antibiotice care, spre deosebire de ceea ce s-a prezentat anterior au două caracteristici aparte şi anume;

- nu mai au o simetrie sferică ci una cilindrică, formând aproximativ un canal;
- nu mai migrează prin membrană, ci se fixează un timp mai mare în aceasta, formând un canal sau „por" temporar.

Formarea unei panze cilindrice cu exterior hidrofob, cum a fost propusa[14] pentru amfotericina B, in solutie apoasa este putin probabila, dar se presupune ca acest fenomen apare in zona interfaciala, prin fluctuatii ale filmului de antibiotic adsorbit si patrunderea lui prin membrana (Fig. 4)

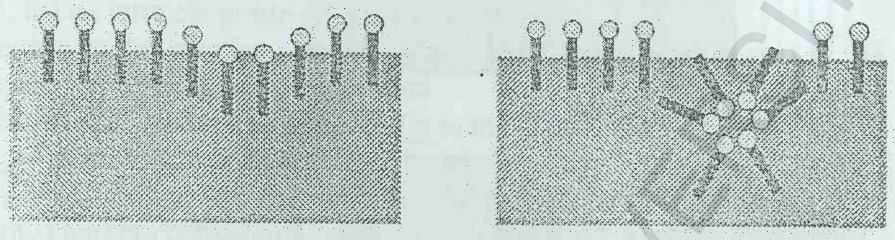


Fig. 4 — Fluctuaţii ale interfeţei membrană/mediu cu formarea de canale temporare.

Fluctuaţiile pot fi ale membranelor înseşi iar antibioticul să fie cel care stabilizează porii formaţi sub influenţa factorilor mecanici sau electrici. Astfel se poate încadra şi acest fenomen într-o clasă mai largă ce cuprinde electro-porarea bistraturilor lipidice, diviziunea şi fuziunea celulelor, care au fost tratate ca fenomene mecanice de încovoiere[15], cu formarea unor complexe intermediare metastabile, ca in teoria vitezelor absolute de reacţie.

Fixarea porilor de antibiotic se face prin legătura hidrofobă între acesta si lipidele membranei. Aici apare o altă caracteristică a fenomenului: efectele sunt remarcabile atunci când antibioticul are mai multe duble legături conjugate (este „polienic") şi când în membrană există şi nuclee sterolice (din acest motiv ele sunt active ca antibiotice numai împotriva fungilor şi altor celule conţinând în membrană cu colesterol[16].

Există şi o diferenţă de proprietăţi fizico-chimice între antibioticele transportoare prezentate anterior şi cele formatoare de pori. Cele dintâi sunt lipofilice şi foarte solubile în hidrocarburi, iar nystatina şi amfotericina sunt amfipatice, foarte puţin solubile în apă şi hidrocarburi.

Mai recent s-au studiat antibiotice formatoare de canale active, atât împotriva germenilor Gram-pozitivi, cât şi împotriva celor Gram-negativi[17]. Cecropinele — obţinute din viermele de mătase Hyalophora cecrofilia, sunt încărcate pozitiv şi se pot lega de membrane, atât prin porţiunea terminală hidrofobă, cât şi prin forţe electrostatice, a doua porţiune terminală fiind încărcată pozitiv.

Succesiunea fazelor care duc la formarea canalelor în membrană, sugerată de datele experimentale ar putea fi cea din fig. 5

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

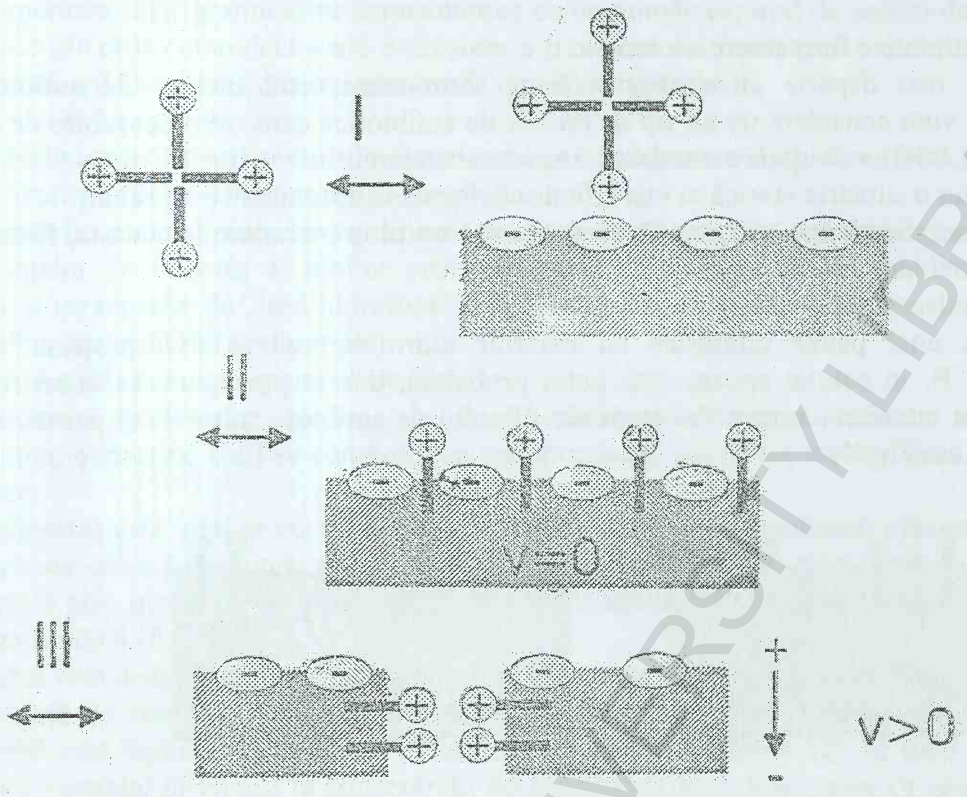


Fig. 5. — Etapele schematice aîe formării canalului de cecropină.

In prima etapă se produce o asociere a micelei de cecropină cu membrana prin forțe electrostatice. Fluctuații în orientarea și distanța față de interfata pot duce la o apropiere suficientă a părții hidrofobe a cecropinei cu lipidele, rezultatul fiind trecerea la o stare mai stabilă cu manifestarea și a interactiunii hidrofobe (etapa a II-a). In momentul aplicării unui potențial pozitiv pe partea pe care este adsorbită molecula de antibiotic, se produce o împingere a sarcinii pozitive de la suprafață mai spre interior, cu formarea unui canal cu interior încărcat pozitiv.

Sarcina pozitivă a canalului (8 sarcini pozitive pentru fiecare moleculă de cecropină) explică selectivitatea canalului pentru anioni. Selectivitatea va creşte cu scăderea tăriei ionice şi va fi maximă când lungimea Debye (extinderea stratului dublu) va fi mai mare decât diametrul porului (deci când acesta se extinde dincolo de mijlocul canalului).

Conductivitatea depinde slab de concentrația de cecropid, ceea ce reprezintă un argument pentru faptul că antibioticul în soluție este agregat sub formă de micelii.

Dependența de voltaj este influențată de prezența colesterolului, fie prin interacțiunea directă cu cecropidul, fie prin efectele colesterolului asupra fluidității membranei.

Semnificația acestor fapte este cu mult mai mare deoarece, dincolo de faptul că se lămuresc unele mecanisme de acțiune, există o corelație bună între concentrațiile la care apar efectele *in vitro* cu concentrațiile eficiente specifice *in vivo* (0,1 — 10 μM).

Concluzia este că cecropidele sunt potent formatoare de canale în condiții fiziologice, fără a fi nevoie de receptori specifici în membrana celulară, pașii esențiali ținând de chimia interfacială.

Aceleași concluzii au fost formulate[18] și privitor la perechile de enantiomeri L și D ai cecropinei A, magaininei 2 (peptid extras din pielea de broască) și A-mellitinei. Faptul că ambii izomeri se comportă similar în ceea ce privește conductivitatea indusă în bistraturile lipidice plane ca și în geneza efectelor antibacteriene, sugerează un mecanism similar: formarea de canale ca urmare a unei interacțiuni ce nu este stereoselectivă și nu implică o

interacțiune stereospecifică cu un receptor proteic, lipidic sau enzimatic. Nu este lipsit de importanță faptul că megainina şi mellitina sunt active şi pe germenii Gram-pozitivi şi pe cei Gram-negativi, sunt şi antimalarice şi nu lizează hematiile. Mellitina este toxică, dar o serie de derivați ai săi se pare că vor putea fi utilizați şi în terapeutică.

Nistatina şi amfotericina cresc[19] în acelaşi timp permeabilitatea şi la apă şi la neelectroliți. Creşterea are acele caracteristici pe care fiziologii le atribuie prezenței porilor în membrane: raportul între permeabilitatea osmotică P_o şi cea difuzională P_d este mai mare ca 1 şi permeabilitatea scade cu creşterea mărimii moleculei. Față de cele cu diametrul mai mare de 4Å membranele sunt practic impermeabile. In plus dependența permeabilității de concentrația antibioticului nu este liniară, ci mult mai puternică (cu puterea a 4-a, până la puterea a 12-a, dependent şi de natura lipidelor). In cazul antibioticelor transportoare dependența permeabilitate—concentrație este ca regulă generală, liniară.

Faptul că amplificarea permeabilității este mai mare atunci când antibioticul este aplicat de ambele laturi ale membranei s-a interpretat ca argument pentru existența a două jumătăți de canal, legate între ele printr-o legătură de hidrogen.

Pentru acidul abscisic, un hormon vegetal, se consideră astfel[20] că au loc procese de „asociere" între moleculele lui de tipul:

$mA \Rightarrow A_m$ formarea unui canal din m molecule

$A_m + A \Leftrightarrow A_{m+1}$ formarea unui canal mai mare

$A_m + A_m \Rightarrow 2m\,A$ coalescența canalelor cu formare de monomeri

Considerând conductanța ca fiind proporțională cu numărul canalelor— n, şi cu suprafața membranei — s, se obține relația:

$G = K\,n\,S = K_1[C_m] = K_1[C]^m$

unde C_m — este concentrația canalelor şi C —- concentrația de acid abscisic. Un argument care sprijină o astfel de interpretare este acela că, dacă se reprezintă grafic logaritmul conductivității în funcție de logaritmul concentrației de acid se obține o dreaptă din a cărei pantă m rezultă egal cu 3. Deci pentru formarea unui canal ar fi necesare minim trei molecule.

In cazul gramicidinei A creşterea permeabilității este proporțională cu radicalul concentrației[21]. Canalele de gramicidină sunt permeabile pentru cationi şi practic impermeabile pentru anioni[22] dar nu sunt selective pentru diferiți cationi, diferențele între aceştia fiind practic date de diferențele dintre mobilitățile lor în soluție. Spre deosebire de alte antibiotice care se unesc intre ele pentru a forma o micelă sau un canal, gramicidină formează singură astfel de structuri prin pliere asupra sa însăşi: canalul este în interiorul moleculei datorită structurii sale elicoidale.

BIBLIOGRAFIE

[1]H. Shott, C.-Young, Electrokinetic studies on bacteria I. Effect of nature, ionic strenght and pH of buffer solution on electrophretic mobiliyv of Streptococcus faecalis and Escherichia coli, J.Pharm. Sci, 61, 182, 1972.

[2]H. Shott, C.-Young, Electrokinetic studies on bacteria II. Effect of nature, ionic strenght and pH of buffer solution on electrophretic mobiliyv of Streptococcus faecalis and Escherichia coli, J.Pharm. Sci, 61, 762, 1972

[3]D. Shah, J. Schulman, Influence of calcium, cholesterol and unsaturation on lecithin monolayers, J. Lipid Res, 8, 215, 1967.

[4]K. Yoshikawa, M. Makino, Self pulsating at an oil/water inter face in the presence of a phospholipid, Chem. Phys. Let., 160, 623, 1989.

[5]D. Blois, J. Swarbrick, Interaction of quaternary ammonium bactericides with biological materia II. Insoluble monolayers studies, J. Pharm. Sci., 61, 393, 1972.

[6]I. Homma, L. Ter-Minassian-Saraga, Electrostatic interaction of charged macromolecules with lipids and segregation in mixed films. Effect of molecular „conformation" and surface

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

potential of monolayers as model membranes, in Electrical phenomenna at the biological membrane level, ed. K. Roux, Elsevier, 273, 1977.

[7] R.D. Keyna, E. Rojas; Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon, J. Physiol, 239, 393, 1974

[8]R.D. Keynes, E. Rojas, Kinetics and steady-state properties of the charged systern controlling sodium conductance in the squid giant axon, J. Physiol, 239, 393, 1974.

[9] H-C Lin, I. Ueda, H. Eyring, Multiple factor analysis of action of local anaesthetics, Proc. Nat. Acad. , USA, 73, 3726, 1976

[10] D. Blois, J. Swabrick, Inter&etion of quaternaryammonium bacterieid'es with biologiculmaterial. I. Conductotnetric studies with cefalin, J. Pharm. Sci, 61, 391, 1972.

[11] R. Tredgold, Dielectric behaviour polipeptides: its its relationship to membrane permeability, in Electrical phenomenna at the biological membrane level, ed. K. Roux, Elsevier, 83, 1977

[12]P Mueller, D. Rudin, Developmcnt of K+-Na+ discrimination in experimental biomolecular lipid membranes by macrocyclic antibiotics, Biochem. Biophys. Res. Commun., 26,398, 1967.

[13] S.C. McLaughlin, G. Szabo, G. Eisenman, S. Ciani, Surface chargc and the conductance of phospholipid membranes, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 1268, 1970

[14] M. Dobler, J.D. Dunitz, J. Krajewski, Structure of the K+ complex with enniantin B, a macrocyclic antibiotic with K+ transport properties, J. Mol. Biol., 42, 603, 1969

[15] Yu Chizmadzev, Structural rearrangements in lipid bilayer membranes, in Electrified Inierfaces in Phvsics, Chemistry and Bloîog^r, Kliiwer Acad. Publ. Dordrecht, Boston. 491 — 507, 1992.

[16] J.O, Lampen, Inierference of polyene aniifungal antibiotics with specific membrane functions. în Biochemical Shidies of Antimicrobial Drugs, BA Newton, PE Reynolds, eds. The Soc, of General Micrpbiology, Cambridge, Mass, 111—130, 1966.

[17] B. Christensen, Jj. Fink, R.B. Merrifieid, D. Mauzerall, Channel-forming properties of escropins and reiated model compounds incorporated into planar lipid membranes, Proc. Nat. Acid. Sci. USA, 85, 5072, 1988.

[18] D. Wade, A. Boman, B. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreii, H.G. Bonxan, RB Merrifield, All-D amina acid-cont aining channel-forming antibiotic pepUdes, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 4761, 1990.

[19] A. Cass, A. Finkelstein, V. Krespi, The ion permeability induced in ihin lipid mewbra-sies by tke polyene antibiotics nystatin and aniphoiericin B, J. Gen. Pliysiol., 58, 100, 1970.

[20] E, Lea, J. Collins, Ckanneî co-operaiiviiy in bilayer lipid membranes in the presence of plani hormone abscisic acid, In: Electrlcal phenomena at the Bioîogical Level Membrane,.ed. E.Roux, Elsevier, 195, 1977

[21]M. Goodal, Structural effcets in the action of antibiotics on the ion permeability in the lipid bilayers. III. Gramicidin A and S and lipid specificity, Biochim. Biophys. Acta, 219, 471, 1970

[22]S.B.Hladky, D.A.Haydon, Ion transfer across lipid membrane in the presence of gramicidin A. Studies on the unit conductance channel. Biochim. Biophys. Acta, 2749, 294, 1972

BCU IAȘI "CENTRALA UNIVERSITARĂ" LIBRARY

CAPITOLUL 3
REZISTENTA BACTERIANA SI INFECTIILE NOSOCOMIALE

Introducere. Infecţiile nosocomiale au fost şi vor rămâne o problemă importantă a hospitalismului, fiind implicate în creşterea morbidităţii şi mortalităţii, influenţând considerabil costurile actului medical. Astfel în S.U.A. infecţiile nosocomiale sunt înregistrate la peste 2 milioane de pacienţi anual, ceea ce reprezintă o rată medie anuală de 8% din totalul spitalizărilor, cu variaţii între 4,3 şi 15%. Tot în Statele Unite, Kohn şi col. raportează că în urma efectelor adverse spitalizării, care includ şi infecţiile nosocomiale, se înregistrează anual între 44.000 şi 98.000 de decese, cu un cost între 17 şi 29 miliarde de dolari.

În Europa incidenţa infecţiilor nosocomiale variază între 6 şi 11%. In Spania de exemplu este raportată o prevalenţă de 7% a infecţiilor nosocomiale între 1994-1999; în Franţa în anul 1996 un studiu la nivel naţional identifică o prevalenţă de 6,7% iar în Elveţia prevalenţa infecţiilor nosocomiale este de 10,4%.

În Romania prevalenţa infecţiilor nosocomiale se încadrează în valorile publicate în lume. Un studiu efectuat în 1995 identifică o rată medie a infecţiilor nosocomiale de 7,8%, cu variaţii între 3,1 şi 16,4%, în funcţie de profilul serviciului şi al spitalului.

Factorul considerat major în cauzalitatea infecţiilor nosocomiale este apariţia unei populaţii microbiene de spital, selecţionată, rezistentă la acţiunea substanţelor antimicrobiene.

La acesta se adaugă factorii favorizanţi care ţin de particularităţile pacientului: patologie asociată, tratamente imunosupresoare; complexitatea manevrelor medicale aplicate; caracteristicile organizatorice şi funcţionale ale serviciului medical şi ale spitalului, nivelul de instruire al personalului medical şi auxiliar.

Este unanim recunoscut că antibioticele exercită un efect presor selectiv asupra agenţilor microbieni. În urma contactului cu substanţele antimicrobiene, bacteriile dezvoltă, prin mecanisme complexe, rezistenţă care este transmisă genetic, cromosomial sau plasmidic generaţiilor următoare sau celorlalte tulpini sau chiar unor specii diferite. Apar astfel în mediul spitalicesc tulpini bacteriene rezistente şi multirezistente care colonizează bolnavii şi care pot genera infecţii grave, care influenţează de multe ori decisiv şi chiar dramatic evoluţia bolnavilor, mai ales a celor din serviciilor de terapie intensivă, de arşi, de prematuri, cu bolnavi imunodeprimaţi etc.

Apariţia şi extinderea tulpinilor de stafilococi aurii rezistenţi la meticilină, a tulpinilor de Klebsiella producătoare de betalactamaze cu spectru lărgit, dezvoltarea într-un ritm rapid a rezistenţei enterococilor la vancomicină şi a pneumococilor şi neiseriilor la penicilină sau apariţia în ultimii ani a tulpinilor de stafilococ auriu rezistent la vancomicină, reprezintă tot atât de importante probleme cu care se confruntă clinicienii, epidemiologii, producătorii de medicamente şi în primul rând pacienţii.

Dezvoltarea şi extinderea tehnicilor şi manevrelor invazive de diagnostic şi tratament, au adus pe lângă creşterea randamentului şi acurateţei actului medical şi noi aspecte ale infecţiilor nosocomiale. Cateterismele endovenoase, chirurgia cardiovasculară au adus în atenţia medicilor infecţiile nosocomiale cu stafilococ epidermidis. Infecţiile tractului urinar post cateterism vezical reprezintă cele mai frecvente infecţii nosocomiale iar enterobacteriaceele, dintre care se evidenţiază Escherichia coli sunt agenţii etiologici cel mai frecvent incriminaţi şi care prezintă rezistenţă şi multirezistenţă la antibiotice.

Terapia cu antibiotice este considerată cauza principală a apariţiei şi dezvoltării rezistenţei microbiene.

Utilizarea nerațională a antibioticelor, administrarea lor "nediscriminatorie", profilaxia excesivă a infecţiilor cu antimicrobiene, tratamentul unor afecţiuni infecţioase cu etiologie alta

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

decât cea bacteriană sunt tot atâtea condiții favorizante pentru dezvoltarea rezistenței microbiene la antibiotice.

Secțiile cu riscul cel mai înalt pentru infecțiile nosocomiale sunt acelea în care complexitatea actului medical este ridicată, în care sunt practicate manevre și tehnici medicale și chirurgicale invazive, unde starea generală a pacienților este deteriorată sau diminuată datorită bolii actuale, afecțiunilor cronice preexistente, cu apărarea antiinfecțioasă deprimată din diverse motive sau unde riscul transmiterii infecțiilor este ridicat.

Un studiu efectuat de Astagneau arată că riscul cel mai crescut pentru apariția infecțiilor nosocomiale este în serviciile de reanimare și terapie intensivă – 35%, urmate de secțiile de chirurgie – 9,8%, iar riscul cel mai redus este în secțiile de boli interne – 2,1%. Date similare sunt prezentate și de Centers for Diseases Control, Atlanta, SUA (CDC).

Toate aceste aspecte constituie motive importante de a analiza evoluția infecțiilor nosocomiale în orice instituție medicală.

Considerând problema extrem de importantă atât pentru evoluția bolnavilor cât și pentru eficiența actului medical, am considerat utilă analiza aspectului rezistenței microbiene la antibiotice ca un criteriu definitor al evoluției infecțiilor nosocomiale înt-o unitate spitalicească. Aducem si pe aceasta cale multumiri colegilor din reteaua medicala, de toate specialitatile, care au colaborat direct sau indirect, la colectarea imensei cantitati de date medicale pe care le-am prelucrat „de la lume adunate si iarasi la lume date".

Istoric. În spitalele secolelor trecute apariția gangrenei, a infecțiilor cutanate, a septicemiilor, înțelese atunci ca "alterarea sângelui prin substanțe putride" numite și "piemii" de Virchow, a infecțiilor puerperale, constituia un aspect obișnuit. Efectul lor asupra pacienților a fost întotdeauna dramatic, mortalitatea în rândul celor operați fiind în jurul a 50%, a infecțiilor puerperale între 25-30%, cu o rată la fel de mare a mortalității.

Folosindu-se mai ales de metoda observației clinice dar și de genialitatea lor medicii, dar mai ales chirurgii acelor vremuri, au încercat să reducă cât mai mult mortalitatea în rândul pacienților lor.

Într-o extrem de succintă istorie a luptei împotriva infecțiilor nosocomiale ar trebui să începem cu celebrul chirurg francez Ambroise Pare (1510-1590) care a contribuit substanțial la reducerea mortalității după amputația membrelor. El a introdus tehnica ligaturării vaselor în locul cauterizerii cu ulei încins. Tot el a descris "infecția putridă de spital" pe care a pus-o pe seama contactului direct între bolnavi și personalul sanitar.

Secolul al XIX-lea a marcat începutul marilor progrese în medicină și biologie. Eforturile unor pionieri ai științelor medicale au adus și impus în atenția colegilor de breaslă importanța igienei și a practicilor aseptice în reducerea mortalității prin infecțiile dobândite în spital.

Obstetricianul maghiar I.P. Semmelweis (1818- 1865) observă că rata infecțiilor puerperale la femeile care năsteau la domiciliu era nesemnificativă comparativ cu rata acestor infecții la cele care năsteau în maternități. În 1840, studiind comportamentul studenților și al medicilor din clinică, a observat că femeile examinate de studenții care nu-și spălau mâinile după ce păraseau sala de anatomie erau cele mai expuse la infecțiile puerperale. Prin simpla supraveghere a igienei personalului medical, obligat să-ți spele mâinile și apoi să le dezinfecteze într-o soluție de clorură de var la intrarea în spital, mortalitatea maternă prin infecții puerperale a fost redusă în maternitate de mai bine de 10 ori (de la 12,2% la 1,2%).

In aceeași perioadă, în Statele Unite O.W. Holmes (1809-1894) publică în anul 1843 "The Contagiousness of Puerperal Fever" în care descrie tehnicile aseptice ce trebuie utilizate în chirurgie și obstetrică pentru a reduce mortalitatea postoperatoire prin infecții.

Un rol remarcabil l-a avut efortul depus de Florence Nightingale (1820-1910) care a pus bazele învățământului în nursing prin înființarea în anul 1860 a "Nightingale School and Home for Nurses at St. Thomas's Hospital". Ea și-a aplicat în educația viitoarelor asistente medicale experiența și ideile pe care le-a aplicat în timpul războiului din Crimeea, unde a activat ca soră șefă a unui spital militar englez. Aplicând cu strictețe regulile igienice, prin

dezinfecția instrumentarului, prin realizarea unor circuite a pacienților în spital și izolarea pacienților cu infecții, F. Nightingale a redus considerabil mortalitatea în rândul pacienților.

Descoperirile lui Luis Pasteur (1822-1895) au permis dezvoltarea pe baza argumentelor științifice a activităților de prevenire a infecțiilor nosocomiale. În anul 1878, într-o memorabilă ședință a Academiei de Chirurgie din Paris, Pasteur expune principiile asepsiei, insistând pe rolul determinant al igienei, al dezinfecției instrumentarului, materialului moale, a mâinilor, precum și a sterilizării instrumentarului.

Pe aceleași baze științifice, chirurgul englez Joseph Lister (1827 – 1912) a introdus pentru prima dată în practica medicală dezinfecția sălilor de operație și a instrumentarului medical cu acid fenic 2-5%; aceeași metodă de dezinfecție a aplicat-o și pentru tratamentul plăgilor infectate și pentru mâinile personalului medical.

Robert Koch (1843-1910) a preconizat sterilizarea instrumentelor și ustensilelor medicale publicând broșura "Die Wund infecktionen" în care arată prezența stafilococului în majoritatea plăgilor care supurează. Ulterior acestei perioade, explozia descoperirilor științifice a permis cunoașterea procesului epidemiologic, identificarea unor noi germeni, caracterizarea acestora.

Un moment crucial în evoluția medicinei l-a reprezentat descoperirea penicilinei de către A. Fleming și introducerea ei în practica medicală și apoi a celorlalte antibiotice.

Demonstrând o excepțională capacitate de adaptare la condițiile de mediu, bacteriile au dezvoltat și dezvoltă în continuare rezistență la substanțele antimicrobiene, prin mecanisme extrem de complexe, ceea ce a readus în actualitate importanța măsurilor igienice în practica spitalicească, după ce acestea au fost pentru o perioadă considerate desuete, locul lor fiind luat de utilizarea în exces a antibioticelor.

Dezvoltarea tehnicilor medicale, mai ales a metodelor invazive, utilizarea medicației imunosupresoare, introducerea în practica curentă a transplantului de organe reprezintă un mare progres științific dar acompaniat de riscul apariției infecțiilor nosocomiale cu germeni dintre cei mai diverși, unii dintre ei fără importanță clinică deosebită în urmă cu 40 de ani, cum ar fi stafilococii coagulazo-negativi, fungii etc.

Statisticile arată că "troica nosocomială" era formată în anii '60 din: **stafilococii** aurii și coagulazonegativi, **piocianic** și **colibacili**. Acestora li s-au adăugat în următoarele decenii: **enterococii**, germenii din genurile **Enterobacter**, **Klebsiella** și **Proteus**, care reprezintă în prezent aproximativ o treime din totalul germenilor implicați în etiologia infecțiilor nosocomiale.

Toate aceste aspecte au condus la dezvoltarea unor strategii menite să reducă rata de apariție a rezistenței microbiene la antibiotice să reducă riscul de infecții nosocomiale prin introducerea unor ghiduri practice referitoare la toate aspectele practicii medicale în spital.

Cu toate eforturile depuse și în pofida dezvoltării unor metode moderne de diagnostic, tratament și profilaxie, infecțiile nosocomiale sunt în continuare o problemă de surprinzătoare actualitate, care pe lângă creșterea morbidității și a mortalității duce și la creșterea considerabilă, între 15-60%, a costurilor asistenței medicale pentru un pacient cu o infecție nosocomială severă sau medie ca formă de manifestare.

Aceste realități sunt prezente în toate unitățile spitalicești și nu numai, motiv pentru care supravegherea, controlul și profilaxia infecțiilor nosocomiale se constituie ca o obligație profesională.

NOTA: Bibliografia este comuna pentru capitolele 3-8 si poate fi consultata la sfarsitul capitolului 8.

BCU IAȘI "GRIGORE T. POPA" UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 4

FENOMENUL DE REZISTENȚĂ BACTERIANĂ LA SUBSTANȚE ANTIMICROBIENE

MECANISMELE REZISTENȚEI MICROBIENE LA ANTIBIOTICE

Încă de la primele aplicații clinice ale antibioticelor s-au semnalat fenomene de rezistență la tratament dar aceste aspecte nu au fost luate în considerație decât mult mai târziu, odată cu extinderea îngrijorătoare a acestui fenomen.

Antibioticele, una dintre cele mai eficiente clase de medicamente, sunt compuşi chimici organici care în contact cu microorganismele le inhibă acestora creşterea sau le omoară.

La început obținute prin prelucrarea unor produse naturale - secrețiile unor fungi sau bacterii - în momentul de față cele mai multe antibiotice sunt obținute prin sinteză chimică. Pentru a fi eficiente, antibioticele trebuie să-şi exercite activitatea antimicrobiană la concentrații plasmatice care nu sunt toxice sau însoțite de efecte secundare.

În pofida extinderii tot mai largi a spectrului şi a gamei de antibiotice, bacteriile se află la rândul lor într-o permanentă adaptare la condițiile mediului în care trăiesc. Printre "eforturile adaptative"ale bacteriilor se numără şi mecanismele prin care acestea dezvoltă rezistență la substanțele antimicrobiene şi în special la antibiotice.

Rezistența microbiană la antibiotice poate fi definită ca abilitatea germenilor patogeni de a supraviețui şi de a se multiplica în prezența uneia sau mai multor substanțe antimicrobiene. Germenii rezistenți sunt sau devin "toleranți" la antibiotice, susträgându-se prin variate modalități efectului antibacterian scontat, după administrarea de doze terapeutice, netoxice pentru organism.

Rezistența microbiană naturală, de specie, sau dobândită, prin apariția de mutante rezistente la antibiotice este o noțiune absolută care trebuie deosebită de pseudorezistență (falsa rezistență), noțiune relativă, întâlnită în practica tratamentelor clinice.

Pseudorezistența sau falsa rezistență este indusă în principal de utilizarea inadecvată a antibioticelor:

-nu s-au folosit antibioticul sau combinația adecvate etiologiei;

-nu s-au realizat concentrații plasmatice eficiente ale antibioticelor;

-apariția rezistenței relative a germenilor patogeni, sensibili *in vi*tro dar insensibili temporar *in vivo*: existența persisterilor, a germenilor cu metabolism redus, forme L etc.

Rezistența microbiană absolută se manifestă atunci când un microorganism nu este influențat *in vitro* de antibiotic sau când in vivo sunt necesare concentrații de antibiotic care ating niveluri toxice pentru organism. Fenomenul este pe deplin acceptat şi în mare parte cunoscut.

Rezistența microbiană dobândită ca fenomen adaptativ al speciilor microbiene față de mediul extern nefavorabil se realizează prin mecanisme diverse, determinate finalmente de specia microbiană implicată şi de tipul de substanță antimicrobiană utilizată.

Mecanismele prin care germenii dezvoltă şi transfera altora capacitatea de a rezista la acțiunea substanțelor antimicrobiene sunt variate şi arată marea variabilitate din mediul înconjurător.

Mecanismele majore prin care o bacterie poate deveni rezistentă la antibiotice sunt: inhibiția enzimatică a antibioticelor; impermeabilitatea membranelor bacteriene; alterarea enzimei-țintă; alterarea țintei intracelulare; supraproducția enzimei-țintă; metaboliți care scurtcircuitează etapele inițiale; pomparea activă în exterior a antibioticelor.

Apariția rezistenței bacteriene la antibiotice a fost întotdeauna corelată cu utilizarea clinică a acestora fără ca întotdeauna cauzalitatea să poată fi stabilită în mod cert.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Apariția sistemelor computerizate de supraveghere a rezistenței la antibiotice ca și organizarea unei adevărate rețele informaționale la nivel național (Franța, Anglia, Suedia, Spania, USA etc.) sau internațional facilitează identificarea rapidă a modalitaților de apariție a rezistenței la substanțe antimicrobiene.

Tehnicile moleculare încep să fie din ce în ce mai mult utilizate în acest scop, genele purtătoare de informații legate de rezistența la substanțe antimicrobiene fiind identificate, caracterizate. Se pot urmări prin tehnici moleculare: modul de achiziție a genelor, transferul informațiilor genetice, procesul epidemiologic de achiziție a rezistenței la antibiotice.

O bacterie inițial sensibilă la un antibiotic poate deveni rezistentă prin diverse căi: poate să-și modifice una din genele ei astfel încât "ținta" antibioticului este modificată și acesta nu-și mai poate exercita acțiunea antibacteriană; o alta modalitate este aceea de a achiziționa o nouă genă care să inactiveze sau să împiedice accesul antibioticului intracelular. Unele gene pot interfera sinteza unor compuși bacterieni care sunt blocați de către antibiotic anulând acțiunea specifică drogului.

Rezistența poate să se instaleze și prin apariția de mutații genetice, definitive.

Mecanismele rezistenței microbiene

Rezistența la antibiotice prin inhibare enzimatică

Producerea de enzime capabile să blocheze acțiunea substanțelor antimicrobiene se pare că este cea mai veche modalitate folosită de microorganisme în lupta lor de supraviețuire în concurența cu alte microorganisme. Fenomenul a fost identificat numai atunci când bacteriile trebuie să se opună acțiunii unor antibiotice naturale, cum ar fi betalactaminele. Față de antibioticele sintetice nu s-au descris mecanisme asemănătoare.

Betalactaminele sunt o clasă de substanțe antimicrobiene care au acțiune bactericidă prin inhibarea sintezei peptidoglicanului din componența peretelui bacterian. Acest proces are loc prin inhibarea unor enzime "transpeptidaze" numite si "proteine care leagă penicilina"(PBP) cu rol în formarea peptidoglicanului din peretele celular; prezența acestuia este esențială conferind acestei structuri rezistență la presiunea osmotică.

Cea mai comună modalitate de rezistență la β-lactamine este aceea a sintezei de către bacterii a unor enzime care inactivează antibioticul. Aceste enzime poartă numele de β-lactamaze și genele care codifică sinteza lor au fost identificate atât în genomul bacterian cât și la nivel plasmidic. Această distribuție explică larga răspândire a β-lactamazelor în populația bacteriană și ușurința cu care ele se pot transmite. Ele pot fi transferate de la o bacterie la alta atât prin conjugare cât și prin transducție sau transformare.

Identificarea β-lactamazelor a avut loc relativ repede după introducerea penicilinelor în practica medicală. Prima izolată a fost TEM-1, în anul 1965 imediat după introducerea ampicilinei în clinică, la nivelul unor tulpini de *Escherichia coli* și *Salmonella paratiphy*. După numai 25 de ani TEM-1 poate fi identificată la nu mai puțin de 28 de specii bacteriene gram-negative, dintre care trebuie amintite *Haemophylus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, Pseudomonas aeruginosa.*

Din punct de vedere structural β-lactamazele sunt împarțite în patru grupe: A, B, C si D. Clasa A este cea mai răspândită, fiind prezentă atât la bacteriile gram-pozitive cât și la cele gram-negative.

Mecanismul de acțiune al β-lactamazelor constă în hidrolizarea penicilinelor și a cefalosporinelor.

TEM-1 β-lactamaza este cea mai răspândită și este diseminată prin intermediul unui transpozon, Tn3. Studiile de epidemiologie evidențiază prezența acestei enzime inactivatoare la toate bacteriile gramnegative.

O altă enzimă inactivatoare de betalactamine este SHV-β-lactamaza, care este structural asemănătoare cu TEM-1 în proporție de 68%.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

β-lactamazele diferă În principal prin numărul de aminoacizi şi prin modificarea situsului unora dintre aceştia. Aceste modificari au apărut ca o reacţie a bacteriilor la presiunea exercitată de introducerea unor noi antibiotice din clasa betalactaminelor, pe de o parte, dar şi la introducerea în practică a inhibitorilor de β-lactamaze, cum ar fi acidul clavulanic.

Introducerea penicilinelor de semisinteză şi a cefalosporinelor cu spectru larg a exercitat şi exercită o presiune selectivă continuă asupra tulpinilor microbiene. Drept urmare au aparut modificări adaptative care au extins spectrul de inhibiţie a antibioticelor betalactamice.

Au aparut astfel β-lactamazele cu spectru lărgit (ESBL). La început acestea au fost izolate la tulpini de E. coli si Klebsiella pneumoniae în anii '80. La sfârşitul anilor '90 aproape toate enterobacteriaceele conţin enzime de tip TEM si SHV modificate, cu spectru lărgit.

Apariţia inhibitorilor de β-lactamaze a dus la apariţia unor mutaţii complexe la nivelul acestor enzime. Astfel, pe lângă păstrarea capacităţii de hidrolizare a antibioticelor, β-lactamazele au devenit "refractare" la inhibitor, care nu se poate lega de enzimă.

O clasă nou identificată de enzime este aceea a metalo-β-lactamazelor. Acestea au fost descrise la nivelul unor germeni gram-negativi în Japonia. Se pare că răspândirea lor nu este încă largă, probabil datorită mecanismului de apariţie, o modificare genetică cromozomială.

O altă clasă de enzime care inactivează clasa omonimă de antibiotice este aceea a enzimelor modificatoare de aminoglicozide (EMA). Acestea au apărut ca o reacţie adaptativă a unor specii bacteriene la aminoglicozide. Davis consideră că acestea au apărut prin modificări la nivelul genomului bacterian, de-a lungul anilor, pentru fiecare aminoglicozid existând o enzimă specifică, apărută în urma unei mutaţii genetice.

În ultimii douăzeci de ani prevalenţa EMA la germenii gramnegativi s-a modificat. Cele mai des întâlnite enzime inainte de 1985 erau enzimele de modificare a gentamicinei, AAC(3)-I, AAC(3)-II şi "aminoglicozid-nucleotidil-transferaza, ANT(2'').De atunci au mai apărut şi au fost identificate enzime specifice de inactivare a amikacinei, a netilmicinei, a tobramicinei.

Din punct de vedere structural se descriu trei clase de EMA: aminoglicozid-N-acetiltransferaze, aminoglicozid-O-adeniltransferaze şi aminoglicozid-O-fosfotransferaze.

Larga şi rapida răspândire a EMA este fără îndoială facilitată de prezenţa genelor care codifică sinteza lor la nivelul integronilor care sunt diseminaţi plasmidic.

Trebuie subliniată ca extrem de importantă pentru practica medicală prezenţa simultană a mai multor enzime diferite la nivelul unor tulpini, ceea ce conferă acestora o rezistenţă multiplă la aminoglicozide.

O alta clasa de enzime care inactiveaza antibiotice sunt cloramfenicol-acetil-transferazele. Acestea sunt răspândite în regiunile unde cloramfenicolul este larg folosit în tratamentul salmonelozelor, holerei, ricketssiozelor. Până în prezent sunt descrise nu mai puţin de 12 gene care codifică sinteza acestor enzime. Sinteza acestor enzime este mediată plasmidic şi se întâlneşte cu mare frecvenţă la germeni gram-negativi (*Enterobacteriaceae, H. influenzae*) de unde a fost răspândită şi la unii gram-pozitivi: *Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Aerococcus.*

Rezistenţa bacteriană prin alterarea enzimei ţintă

Dezvoltarea rezistenţei la antibiotice prin reducerea afinităţii ţintelor lor enzimatice apare rapid mai ales pentru antibioticele care inactivează o singură ţintă. Un exemplu în acest sens este rifampicina care acţionează la nivelul unei singure structuri, ARN-polimeraza.

Rezistenţa prin alterarea ţintei la antibiotice care inactivează mai multe "enzime-ţintă", cum este penicilina, se instalează mult mai lent. Rezistenţa la antibioticele naturale recunoaşte alte mecanisme cum sunt inactivarea enzimatică, modificarea ţintei şi accelerarea efluxului antibioticului din celulă.

Se consideră că genele care codifică rezistenţa au o vechime considerabilă, mai ales la bacteriile telurice, numărând sute de milioane de ani. Funcţia lor era de a le proteja de bacteriile care erau producătoare de substanţe antimicrobiene.

Enzimele care inactivează antibioticele obținute pe cale sintetică, cum sunt chinolonele, sulfonamidele şi trimetoprimul, sunt de dată mult mai recentă, respectiv au apărut în urma contactului microbilor cu antibioticele. Rezistența se câstigă prin achiziționarea unor gene noi care codifică sinteza unor enzime-țintă modificate, cu o afinitate mult redusă pentru antibiotic.

Mecanismul rezistenței prin alterarea țintei sau receptorilor presupune achiziția de noi gene care sunt transportate de plasmide sau se află la nivelul unor transpozoni. Rezultă modificarea enzimei țintă care nu va mai lega antibioticul sau care nu va mai fi inactivată de acesta.

Nu este imposibilă nici apariția rezistenței în urma unei mutații sau recombinări genetice care poate duce la sinteza unei enzime normale dar cu afinitatea scăzută pentru antibiotic. Acest mecanism este prezent mai ales la acei germeni la care mecanismul inactivării enzimatice lipseşte.

Rezistența la betalactamine

Penicilinele acționează ca niște structuri analoge transpeptidazelor.

Transpeptidazele sunt cunoscute şi sub numele de proteine fixatoare de penicilină, PBP. Există două tipuri de transpeptidaze: unele esențiale, cu greutate moleculară mare (PBP-M) cu funcție importantă în sinteza peptidoglicanului. Inactivarea acestora este urmată de moartea celulei. Alte transpeptidaze cu greutate moleculară mică, PBP-L au fost descrise la nivelul bacteriilor şi nu au un rol esențial în metabolismul celular. Inactivarea lor nu este urmată de moartea celulei.

Cel mai des întâlnit mecanism de inactivare a betalactaminelor este acela al inhibării enzimatice. Cu toate acestea exista numeroase specii care nu poseda acest mecanism. Ca urmare acestea pot dezvolta rezistența la β-lactamine prin două mecanisme: germenii gramnegativi prin reducerea permeabilității membranei externe sau prin sinteza unor transpeptidaze (PBP-M) cu afinitate scăzută pentru β-lactamine; la germenii grampozitivi intervine doar modificarea PBP-M. Mecanismul este relativ restrâns datorita faptului că β-lactaminele acționează pe ținte multiple ceea ce presupune modificări complexe. De exemplu *Neisseria gonorrhoeae* are doua PBP-M esențiale şi una neesențiala, PBP-L.

Pentru a dezvolta rezistența sunt necesare atât modificarea afinității PBP-M la betalactamine cât şi modificarea permeabilității membranei externe.

Streptococcus pneumoniae posedă cinci transpeptidaze şi la aceasta specie nu au fost identificate β-lactamaze. Ca urmare rezistența la β-lactamine apare în urma modificării afinității PBP la antibiotic. Pentru a deveni rezistenți la benzilpenicilina, pneumococii trebuie să modifice structura a cel putin patru din cele cinci PBP-M pe care le posedă. Modificările constau în reaşezarea aminoacizilor şi nu în apariția unor mutații. În acelaşi timp aceste modificări adaptative se manifestă încrucişat şi față de alte betalactamine, chiar şi la cefalosporinele de generația a III-a.

Mecanismul apariției modificărilor la nivelul PBP este relativ necunoscut.

O explicație ar fi schimbul de gene între specii înrudite. Mecanismul a fost identificat la *Neisseria gonorrhoeae* şi *N. meningitidis* care a achiziționat gena de sinteză a unei PBP-2 rezistentă la benzilpenicilină de la o specie înrudită, Neisseria flavescens.

Un model particular îl oferă stafilococii meticilino-rezistenți. Staphylococcus aureus nu este transformabil şi mecanismul achiziției rezistenței difera complet de cel al neiseriilor şi al pneumococilor. Stafilococii meticilino-rezistenți produc patru PBP-M cu afinitate normală față de β-lactamine. În plus aceştia dețin şi o PBP-M cu afinitate redusă pentru β-lactamine. Sinteza acestei ultime PBP este mediată de o genă mecA care a fost achiziționată prin intermediul unui transpozon. Ceea ce este surprinzător este că această PBP a preluat funcțiile celorlalte PBP care sunt blocate de peniciline.

Acest mecanism pare să fie analog cu rezistența la sulfonamide şi trimetoprim în care o "țintă" alternativă, o enzimă, cu afinitate redusă pentru antibiotic este achiziționată.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Rifampicina şi chinolonele inhibă o enzimă bacteriană şi nu par să acţioneze ca un substrat analog. Dezvoltarea rezistenţei la aceste antibiotice nu se realizează prin achiziţionarea de enzime inactivatoare.

Rezistenţa la rifampicină apare în urma modificării ADN-polimerazei, care este ţinta acesteia. Are loc substituţia unor aminoacizi, gradul de rezistenţă este în corelaţie directă cu gradul de modificare a enzimei. La E. coli rezistentă la rifampicină au fost identificate inserţii, amputări ale unor secvenţe de aminoacizi cu conservarea secvenţei subunităţii β a ADN-polimerazei, ceea ce permite enzimei să-şi exercite funcţia şi în acelaşi timp să devină "insensibilă" la contactul cu antibioticul. Acelaşi mecanism a fost descris şi la tulpinile de Mycobacterium tuberculosis rezistente la rifampicină.

Chinolonele acţionează la nivelul ADN-girazei pe care o inhibă. Modificările la nivelul ADN-girazei, respectiv a subunităţii "A" a acesteia, reduc semnificativ inactivarea enzimei de către antibiotice. Mecanismul de achiziţionare este genetic prin apariţia unei modificări la nivelul genei gyrA care codifică sinteza acesteia. La germenii gramnegativi s-a mai descris şi apariţia unui mecanism suplimentar de achiziţie a rezistenţei la chinolone. S-a observat că o mutaţie suplimentară a subunităţii "A" a ADN-girazei duce la reducerea permeabilităţii membranei externe la antibiotic. În acest mod rezistenţa este complexă, prin două mecanisme diferite. Presiunea exercitată de chinolone asupra populatiei bacteriene nu face decât să selecteze tulpinile cu un grad înalt de rezistenţă.

Rezistenţa la fluorochinolone a stafilococilor meticilino-rezistenţi este achiziţionată prin substituţia unui singur aminoacid la nivelul subunităţii "A" a ADN-girazei. Concentraţia minimă inhibitorie a ciprofloxacinei creşte spectaculos de la 16 la 128 μg/ml. Accelerarea efluxului antibioticului a fost descrisă la unele tulpini, consolidând rezistenţa la antimicrobian.

Rezistenţa prin reducerea permeabilităţii membranelor

Bacteriile sunt organisme unicelulare şi citoplasma lor este separată de mediul extern prin membrana citoplasmatica. Permeabilitatea membranei este asigurată de o structură lipidică dublu stratificată şi traversarea acesteia este invers proporţională cu fluiditatea lui. Nu este posibil să reduci permeabilitatea membranară fără a altera funcţiile acesteia. Pentru a se proteja împotriva substanţelor care pot penetra membrana citoplasmatică bacteriile şi-au construit o "barieră adiţională", o membrană în afara membranei citoplasmatice. Aceasta nouă structură este cunoscută ca membrana externă „outer-membrane".

Bacteriile grampozitive sunt înconjurate de un perete bacterian care este alcatuit din peptidoglican; deşi rezistentă din punct de vedere mecanic, această structură nu oferă protecţia necesară împotriva difuzării intracelulare a moleculelor mici, cum sunt cele ale antibioticelor, deoarece reţeaua alcatuită este prea rară.

În contrast, germenii gram-negativi sunt dotaţi şi cu membrana externă, care funcţionează ca o barieră. Stratul extern al acestei membrane are o compoziţie mai putin obişnuită, fiind format din lipopolizaharid, diferit de glicerofosfolipidul identificat în marea majoritate a membranelor biologice. Se găsesc lanţuri de acizi graşi saturaţi. Deoarece acizii graşi nesaturaţi rămân în interiorul membranei externe, spre partea citoplasmatică, interiorul membranei îşi păstrează fluiditatea care însă este mult diminuată la exterior prin prezenţa acizilor graşi saturaţi. Acest lucru duce şi la schimbarea permeabilităţii prin reducerea afinităţii pentru substanţele lipofile. Datorită structurii membranei externe antibioticele cu structura lipofilă nu mai pot pătrunde în citoplasma bacteriană. În acelaşi timp bacteriile sunt obligate să dezvolte mecanisme noi de transport intracelular şi extracelular a substanţelor nutritive necesare metabolismului lor. Pentru acest scop la nivelul membranei externe se găsesc proteine speciale, numite porine, care produc canale de difuzie apoasă nespecifice.

La rândul lor porinele contribuie la reducerea activităţii antibioticelor prin excluderea lor, în diferite moduri.

La *Escherichia coli*, dimensiunile acestor canale sunt extrem de mici, 7-10Å, ceea ce face influxul celor mai multe antibiotice imposibil sau extrem de lent. De asemenea are loc şi o

modificare a polarităților moleculelor de apă care la rândul ei influențează negativ afluxul moleculelor lipofile ale antibioticului.

Totuşi acest mecanism de protecție este depăşit de moleculele antibiotice hidrofile care traversează cu mare uşurință membrana externă. Acesta este cazul betalactaminelor semisintetice care însă sunt inactivate prin alte mecanisme.

O strategie interesantă este adoptată de unii germeni telurici cum ar fi *Pseudomonas aeruginosa*. Acesta închide canalele porine şi lasă funcționale doar 1% din ele. Acest fapt duce în mod evident la reducerea drastică a cantității de compus care pătrunde în celulă. În acelaşi timp bacteria dezvoltă noi sisteme canaliculare, bazate pe structuri noi, care permit afluxul de substanțe nutritive. Apare astfel o rezistență intrinsecă la antibiotice care nu este determinată de modificări cromozomiale sau de achiziția unor plasmide R. Mecanismul se regăseşte şi la micobacterii care sunt filogenetic derivate din *P. aeruginosa*. Acest lucru explică rezistența intrinsecă a acestei familii față de cele mai multe antibiotice. Aspectul este extrem de important şi pune probleme majore de sănătate publică în situația în care şi față de puținele antibiotice active pe *M. tuberculosis* a început să se manifeste rezistența.

Structura membranei externe a micobacteriilor este şi mai diferită, unul din straturi fiind alcătuit din lipide complet diferite de cele întâlnite la alte bacterii. Influxul de antibiotice este de zece ori mai scăzut comparativ cu cel la *P. aeruginosa*.

Mecanismul de "impermeabilizare" poate fi achiziționat şi de germeni care nu au membrana externă. Modificări la nivelul canalelor apoase (porinele) pot duce la scăderea afluxului intracelular al antibioticului.

Eficacitatea imipenemului, o betalactamină, asupra tulpinilor de Pseudomonas aeruginosa se datorează faptului că drogul pentru a intra în celulă foloseşte sistemul "canalicular" care transportă aminoacizii intracelular. Acele tulpini care au devenit rezistente la imipenem au "pierdut" sistemul de transport al aminoacizilor.

Unele specii bacteriene au membrane cu un grad de permeabilitate redus față de substanțe străine lor, ceea ce le conferă o rezistență intrinsecă la antibiotice.

Aceste bacterii sunt foarte frecvent întâlnite mai ales în unitățile spitaliceşti, fiind selecționate prin abuzul şi folosirea incorectă a antibioticelor.

Într-o modalitate similară, betalactaminele care au fost concepute să imite compuşi chelatori de fier (siderofori) în timpul transportului lor transmembranar pot selecta tulpini rezistente în rândul acelora care nu posedă acest sistem.

Modificarea permeabilității de membrană este o modalitate prin care bacteriile devin rezistente sau partial rezistente la antibiotice, mai ales datorită afluxului redus de antibiotice la nivelul celulei bacteriene. Se consideră că acest mecanism nu este întotdeauna extrem de eficient şi de regulă ele se asociază cu alte modalități folosite de bacterii pentru a se proteja de acțiunea antibioticelor. De exemplu betalactaminele care au traversat bariera formată de membrana externă la tulpinile de *E. coli* sunt inactivate de betalactamazele din spațiul periplasmic.

Pomparea activă a antibioticului în afara celulei

Rezistența bacteriană la antibiotice prin activitatea pompei de eflux a fost observată pentru prima dată la E. coli când Levy şi col. au identificat mecanismul prin care aceasta specie bacteriană îşi manifestă rezistența la tetraciclină.

Exista pompe de eflux simple care sunt reprezentate de o singură proteină cu rol de transportor şi care acționează doar la nivelul membranei citoplasmatice. Acest tip de pompă nu este foarte eficient fiind permanent în concurență cu afluxul antibioticelor cu structură lipofilă. La nivelul bacteriilor gramnegative se descrie o pompă de eflux complexă, alcatuită din structuri diferite care traversează atât membrana citoplasmatică cât şi membrana externă, evacuând drogul din spatiul periplasmic. Au fost identificate mai multe structuri proteice implicate în acest mecanism.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acestea, pe baza structurii moleculare, a mecanismului de acţiune şi a secvenţelor homologe, pot fi împărţite în patru familii:

a) - familia facilitatorilor majori (FM);

b) - familia rezistenţă-nodulare-divizare (RND);

c) - familia Stafilococilor multidrug rezistenţi (SMR);

d) - familia transportorilor de ATP "adenosine triphosphate-binding cassette" (ABC).

Fiecare component al primelor trei familii (a,b,c,) este practic o proteină din componenţa membranei citoplasmatice cu rol de a scoate drogul din celulă printr-un mecanism ionic (H^+).

Sistemul activ de eflux transportă antibioticul din celulă în spaţiul periplasmic. Eliminarea drogului este favorizată şi de alte proteine de la nivelul membranei externe care acţionează auxiliar şi care ar realiza punţi de legătură între membrana externă şi membrana citoplasmatică. La nivelul acestor punţi de legatură are loc o accelerare a efluxului medicamentului. Se pare că există legături directe între porine şi proteinele accesorii ceea ce permite formarea unor complexe cu rol de "canal deschis", cu sens unic, centrifug pentru drog.

Se confirmă ideea exprimată mai devreme că scăderea permeabilităţii de membrană nu este suficientă pentru a asigura rezistenţa bacteriei la antibiotic. La nivel bacterian apare un sistem complex care, pe baza unor mecanisme metabolice şi energetice (proteine de transport, ATP, porine, H^+), elimină drogul din celulă.

La unii germeni se asociază şi modificarea permeabilităţii de membrană ceea ce creşte semnificativ gradul de rezistenţă. Astfel se explică rezistenţa intrinsecă a unor germeni gramnegativi nu numai la antibiotice dar şi la coloranţi şi dezinfectante.

Pompele de eflux sunt codificate genetic şi prezintă o mare specificitate de transport extracelular a substanţelor indezirabile. De exemplu familia facilitatorilor majori-FM transportă omologi ai glucozei; unele transportă proteine ale eucariotelor cum ar fi ATR-1 pentru fungi; familia RND este implicată în efluxul de ioni de cadmiu, cobalt şi nichel.

La *Pseudomonas aeruginosa*, în absenţa plasmidelor R, sunt singurele mecanisme care ar putea fi responsabile de rezistenţa la cloramfenicol, tetraciclină, fluorochinolone. Diferitele grade de rezistenţă s-ar datora în principal permeabilităţii diferite faţă de antibiotice deoarece chiar tulpinile sălbatice (comunitare) de piocianic elimina eficient din celulă antibiotice cum ar fi norfloxacina.

Escherichia coli are o permeabilitate crescută pentru antibioticele hidrofilice care traversează rapid membrana externă dar este intrinsec rezistentă la antibiotice lipofilice (eritromicina, oxazolidinonele, acidul fusidic) prin activarea pompei de eflux.

Observaţia are importanţă practică deosebită pentru dezvoltarea unor agenţi terapeutici eficienţi. Nikaido sugerează că utilizarea unor derivaţi lipofilici de tetraciclină sau de fluorochinolone sunt mult mai activi pe tulpini de germeni grampozitivi rezistente la formele farmaceutice actuale; nu acelaşi lucru se întâmpla la bacteriile gramnegative care, datorită permeabilităţii selective a membranei externe pentru substanţele lipofilice, manifestă o rezistenţă intrinsecă pentru aceste substanţe prin reducerea afluxului intracitoplasmatic.

Rezistenţa la antibiotice prin alterarea "ţintei intracelulare"

Asupra antibiticelor naturale bacteriile folosesc sisteme de protecţie care se pare că sunt ancestrale şi care le-au permis să supravieţuiască în condiţiile concurenţei cu alte bacterii, unele dintre ele producătoare de substanţe antibiotice.

În confirmarea acestei teorii vine şi faptul că împotriva antibioticelor sintetice, moderne (chinolone, sulfonamide, trimetoprim etc.) nu au fost identificate enzime care să le inactiveze. Cel mai frecvent este întâlnită dezvoltarea unor variante atipice, alterate ale ţintelor normale, care duce la creşterea rezistenţei la antibiotice.

Asemenea modificări pot favoriza şi achiziţionarea unor noi gene, vehiculate de plasmide şi transpozoni; rezultă în urma acestui fenomen modificarea esenţială a enzimei ţintă care nu va mai lega absolut deloc antibioticul, cum se întâmplă în cazul rezistenţei la macrolide prin metilarea la nivel 23S a ARN ribozomal. De asemenea rezistenţa poate rezulta în urma

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mutațiilor sau recombinărilor genetice ale țintei, cu păstrarea intactă a structurii acesteia dar cu pierderea afinității pentru drog.

Dezvoltarea unor ținte enzimatice care reduc afinitatea pentru antibiotic este un mecanism major al rezistenței microbiene.

Alterarea țintei bacteriene proteice este un mecanism manifestat în dezvoltarea rezistenți față de tetraciclină, macrolide, trimetoprim, chinolone, rifampicină, aminoglicozide, betalactamine.

Mecanismul presupune modificarea țintei proteice cu reducerea sau dispariția afinității pentru drog, sinteza de noi proteine care preiau funcția țintelor și care nu sunt recunoscute de antibiotic. Se mai descrie și supraproducția de proteină-țintă care are drept scop blocarea antibioticului iar surplusul să-și îndeplinească funcția metabolică în celula bacteriană.

Toate aceste modificări sunt codificate genetic și genele responsabile au fost identificate la nivelul plasmidelor și al transpozomilor. Acest fapt permite răspândirea largă a acestor gene atât la tulpinile aceleiași specii cât și la specii bacteriene diferite.

Levy descrie gena tetM asociată unui transpozom de origine probabil streptococică dar care la momentul respectiv era răspândită la nivelul a numeroase bacterii grampozitive și gramnegative, la Ureaplasma spp. și Mycoplasma spp. Această genă codifică sinteza unui factor care protejează ribozomii împotriva fixării tetraciclinei și implicit a blocării fenomenului de translație la nivelul ARN ribozomal.

Un mecanism asemănător se descrie și la stafilococii rezistenți la macrolide și lincosamide. La nivelul ARN-ului ribozomal secvența 23S este metilată prin intermediul unei gene erm. Se descriu trei tipuri de gene: A, B și C. Diferențele între acestea constau în secvențe minime de aminoacizi care conferă fiecăreia o anume specificitate în raport cu antibioticul întâlnit. Gena ermB este specifică clindamicinei, genele A si C au fost identificate la tulpinile rezistente la eritromicină dar și la lincosamide. La nivelul stafilococilor rezistenți la macrolide au fost identificate toate cele trei gene, existând posibilitatea schimbului și achiziției încrucișate a acestora. Modificare secvențelor proteice asociate ARN-ului ribozomal se descrie și la *Mycobacterium tuberculosis, Neisseria gonorrhoeae, Staphylococcus aureus*, devenite rezistente la aminoglicozide.

Alterarea țintei proteice se descrie și la dezvoltarea rezistenței față de trimetoprim și sulfonamide. Aceste chimioterapice intervin în metabolismul acidului folic, acționând ca analogi ai dihidropteroat-sintetazei și tetrahidrofolat-reductazei, blocând metabolismul acidului folic și producând moartea celulei microbiene.

Pentru a contracara acțiunea drogului antimicrobian celula bacteriană dezvoltă două mecanisme: unul constă în supraproducția de proteină-țintă care duce la blocarea întregii cantități de antimicrobian aflată intracelular; surplusul enzimatic își exercită astfel funcția metabolică. Cel de-al doilea mecanism constă în sinteza unei proteine-țintă sau enzime-țintă nouă, cu aceeași funcție ca și "ținta" dar care nu mai este recunoscută de antimicrobian.

La stafilococi sensibilitatea la trimetoprim scade considerabil, fiind nevoie de cantități mari de chimioterapic pentru a inhiba creșterea bacteriană, concentrația minimă inhibitorie crescînd de peste 10 ori și depășind cu mult doza toxică pentru organism.

Mecanismele transmiterii rezistenței bacteriene la antibiotice:

Modalitățile prin care bacteriile dobândesc și transmit proprietatea de a rezista la acțiunea antibioticelor sunt la fel de importante ca și mecanismele biochimice prin care acțiunea antimicrobienelor este blocată.

Rezistența poate fi dobândită prin transfer cromozomial sau mutații genetice, cu transmitere verticală la generația următoare și prin transfer extracromozomial, adică prin achiziționarea orizontală a genelor rezistenței de la o bacterie rezistentă la o alta sensibilă, prin intermediul plasmidelor.

a) Transferul cromozomial se întâlneste mult mai rar decât cel extracromozomial. Mutațiile cromozomiale apar brusc, la un singur antibiotic și sunt definitive.

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mecanisme de apariție a mutatiilor cromozomiale sunt:

-schimbarea unui singur nucleotid, cu alterarea locului de fixare a antibioticului;

-transpoziția unei secvențe mari de ADN dintr-un loc într-altul, prin intermediul unor secvențe de inserție și transpozoni, care deplasează determinanții de rezistență independent de cromozomul bacterian.

b) Transferul extracromozomial sau mutația extracromozomială este mult mai frecvent, reprezentând aproximativ 90% din total și având importanță practică.

Transferul cromozomial

Mutațiile cromozomiale, spontane sau induse de agenți mutageni și în mod special de antibiotice, sunt genotipice, cu transmitere verticală la generațiile următoare; transmiterea se face la acestea fără contactul cu antibioticul.

Mutația apare la o specie susceptibilă și are la bază selecția mutantelor prin prezența antibioticului/antibioticelor , care distruge tulpinile sensibile.

Rezistența la streptomicină presupune mutații la nivel ribozomal, cea la chinolone mutații la nivelul genei care codifică sinteza girazei. Rezistența la rifampicină se instalează în urma mutației la nivelul genei ARN-polimerazei.

Mutațiile pot să apară la niveluri diferite. Astfel, ele se pot manifesta la nivelul genelor care codifică "proteina țintă" sau a celei care "leagă antibioticul" anulându-se mecanismul de acțiune al substanței antimicrobiene.

La nivelul populațiilor bacteriene se consideră că există mutante care posedă în diferite grade rezistența față de antibiotice naturale fără a se demonstra că această rezistență este rezultanta contactului acestor bacterii cu antibiotice. Aceste mutații au un caracter întâmplător și, cel putin teoretic, ar conferi o potențială rezistență tulpinilor care le posedă la o eventuală expunere la antibiotice.

Unii agenți microbieni dezvoltă mutații imediate la expunerea la unele antibiotice. Așa se întâmplă dacă *Staphylococcus aureus* sau *E. coli* sunt expuse la rifampicină. Apare o mutație la nivelul ARN-polimerazei care duce la anularea activității antibioticului pe enzimă într-o singură etapă.

Mutațiile pot apărea și treptat, în mai multe etape, fiecare dintre ele aducând un anume grad de alterare a susceptibilității la antibiotic, până la rezistența totală. În acest mod se instalează rezistența pneumococilor la ceftazidima.

Mutațiile cromozomiale au drept rezultat mai ales creșterea cantității de enzimă țintă, supraproducția de antagoniști ai antibioticelor și realizarea unor căi metabolice altele decât cele inhibate de antibiotic.

Transferul extracromozomial

Rezistența extracromozomială (episomală, plasmidică, transmisibilă sau infecțioasă) se realizează prin transmiterea de plasmide de la o bacterie la alta, fie în cadrul aceleiași specii, fie la doi membri a două specii diferite dar cu habitat comun în organism, mai ales în cadrul florei intestinale condiționat patogenă.

Rezistența astfel dobândită poate deveni larg răspândită atât prin clonarea tulpinii rezistente cât și prin schimburi genetice între speciile rezistente și cele sensibile la antibiotice.

De exemplu, toate tulpinile meticilino-rezistente de Staphylococcus aureus par a fi derivate dintr-o tulpină ancestrală care a achiziționat o gena, mecA, care codifică slaba afinitate a proteinelor fixatoare de penicilină. Acestă genă se poate transmite orizontal, la bacteriile cu care vine în contact. În contrast, gena care codifică sinteza β-lactamazelor la stafilococi este de natură plasmidică și are o largă răspândire în numeroase tulpini și specii bacteriene, chiar neînrudite, cum ar fi de exemplu enterococii.

Plasmida este un fragment de ADN bacterian autonom (neataşat de cromozom, material genetic extracromozomial) purtător al unei informații genetice speciale , care influențează metabolismul celular, rezistența la substanțe antimicrobiene. Plasmidele se multiplică

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

independent de cromozomul bacteriei gazdă. Caracteristicile lor variază de la o plasmidă la alta.

De regulă multiplicarea lor are loc în acelaşi timp cu multiplicare celulei gazdă (replicarea în fază), în scopul supravieţuirii în bacteria gazdă. Unele plasmide pot infecta doar o anume specie sau familie cum este cazul factorului F pentru *E. coli* sau dimpotrivă, pot fi găzduite de o mare varietate microbiană cum se întâmplă în cazul familiei P identificată practic la toţi germenii gram-negativi.

Transferabilitatea de la o celulă la alta reprezintă o altă caracteristică a plasmidelor şi constă în transferul de la o bacterie la alta prin resurse proprii. Posedă această calitate plasmidele de tip F şi P, cei mai mulţi factori R. Există şi plasmide care nu posedă această proprietate, ele fiind transferate prin intermediul plasmidelor de alte tipuri.

Mobilitatea caracterizează plasmidele ce nu se pot transfera autonom dar se pot ataşa de alte plasmide în acest scop.

Incompatibilitatea se manifestă atunci când două plasmide de acelaşi fel sunt prezente în aceeaşi celulă gazdă.

Mărimea plasmidelor diferă de la un tip la altul. Factorul F reprezintă 1% din cromozomul *E. coli*. Unele plasmide uriaşe pot reprezenta până la 10% din mărimea cromozomului bacterian.

Plasmidele R sau factorul de rezistenţă R

Sunt acele plasmide care posedă şi transmit informaţiile referitoare la rezistenţa la substanţe antimicrobiene. Plasmidele de rezistenţă microbiană la antibiotice, descrise iniţial de Watanabe în 1960 sunt elemente genetice extracromozomiale care conferă celulei purtătoare rezistenţa la unul sau mai multe antibiotice.

Rezistenţa plasmidică este genotipică, cu transmitere orizontala şi/sau verticală.

Factorul R a existat dintotdeauna, înaintea introducerii în practică a antibioticelor, chiar dacă mai putin exprimat. Probabil rolul lor era de a codifica unele procese metabolice. Sub uriaşa presiune exercitată de antibiotice, plasmidele au colectat şi genele rezistenţei de la bacteriile producătoare de substanţe antibacteriene care le protejează şi pe ele însele.

Plasmidele R au fost evidenţiate la *E. coli, Proteus, Salmonella, Shigellae, Pseudomonas, Klebsiella, Erwinia, Yersinia, Serattia*, stafilococi, streptococi, clostridii etc. O importanţă deosebită o au plasmidelele R identificate la germenii cu habitat intestinal care au o diseminare foarte largă în populaţie.

Din punct de vedere molecular plasmidele R se prezintă fie sub forma unor molecule de ADN dublu catenar, circulare, închise şi răsucite sub formă suprahelicoidală (supercoiled) fie sub forma unor molecule dublu catenare, circulare, care prezintă o "nişă" (breşă) pe una din catene ("nicked duplex loop").

Plasmidele R pot transporta una sau mai multe "rezistenţe" (multirezistenţa) la antibiotice şi la prezenţa unor metale grele. La nivelul lor au fost identificate şi gene pentru colicine, factorii de virulenţă etc.

Factorul R recunoaşte mai multe familii:

- familia F alcatuită dintr-o mare varietate de plasmide caracterizate prin capacitatea de autotransferabilitate şi prin posibilitatea de a transfera şi plasmide non-transferabile. Gene ale rezistenţei la antibacteriene sunt destinate rezistenţei la betalactamine, sinteza factorilor de inactivare a aminoglicozidelor, modificarea ţintei pentru cloramfenicol, tetracicline şi sulfonamide;
- familia I transportă atât gene ale rezistenţei antibacteriene cât şi determinanţi ai colicinelor; aceste plasmide au capacitatea de a mobiliza şi alte plasmide;
- familia P este foarte larg răspândită, practic la nivelul tuturor bacteriilor gramnegative. Pot genera între una şi cinci copii într-o celulă gazdă. La nivelul lor au fost identificate gene care codifică rezistenţa faţă de betalactamine, aminoglicozide, tetraciclina,sulfonamide, trimetoprim;

- familia X se caracterizează prin numărul mare de copii intracelulare, până la 15, sunt autotransferabile şi codifică rezistenţa pentru streptomicină şi betalactamine.

Prin intermediul plasmidelor R se transmit următoarele mecanisme de rezistenţă la antimicrobiene:

-blocarea transportului antibioticului în celulă;

-modificarea structurală a ţintei pe care acţionează antibioticul;

-rezistenţa consecutivă utilizării unei căi alternative (paralelă) celei perturbate de antimicrobian;

-inactivarea antibioticului prin modificări enzimatice.

Trebuie subliniat că plasmidele pot fi dobândite, pierdute de bacterii sau transmise la alte bacterii.

Plasmidele se transmit de la o bacterie la alta prin următoarele mecanisme:

-transducţie fagică, plasmida fiind preluată de un bacteriofag şi transferată într-o bacterie necontaminată (fără plasmidă);

-transformare, materialul plasmidic este preluat direct de alt microorganism în urma distrugerii unei bacterii.

-conjugare (recombinare), prin pili sexuali;

1. Transductia fagica apare prin intervenţia bacteriofagilor care contin ADN bacterian preluat de la bacteria parazitată anterior şi încorporat în învelişul proteic propriu. Dacă în materialul genetic se găseşte şi o genă care induce rezistenţa bacteriană, este evident că o bacterie nou infectată de bacteriofag capată şi calitatea de a fi rezistentă la antibioticul faţă de care gena codifică informaţia. În acelaşi timp această bacterie poate transmite mai departe, pe cale verticală noua proprietate dobândită.

Prin acest mecanism sunt transmise plasmidele care codifică rezistenţa la antibiotice a numeroase specii bacteriene. Dintre acestea amintim, datorită importanţei clinice, tulpinile de stafilococi, care capătă rezistenţă prin transducţia fagică la eritromicină, cloramfenicol şi primesc informaţia genetică de a sintetiza β-lactamaze. Transducţia este limitată la specii relativ înrudite care pot fi parazitate de bacteriofagul respectiv.

2. Transformarea a fost descrisă în 1928 de Griffith la streptococi şi presupune preluarea de ADN liber din mediul înconjurător al bacteriei, plasmidic şi încorporarea acestuia în genomul bacterian prin recombinare. Bacteriile astfel "infectate" devin rezistente la antibiotice. Rezistenţa astfel dobândită se poate transmite atât vertical cât şi orizontal.

Transformarea permite preluarea unor secvenţe mari de ADN heterolog. Astfel se explica apariţia genelor "mozaic" care reduc afinitatea la penicilină prin modificarea proteinelor fixatoare de penicilină- PBP.

Fenomenul a fost identificat la neisserii şi pneumococi. La nivelul pneumococilor are loc alterarea proteinelor de legătură (PBP). Analiza secvenţelor nucleotidice ale genelor care codifică sinteza PBP alterate indică prezenţa unor fragmente străine de ADN, de natură necunoscută.

3. Conjugarea este definită ca transferul de gene de la o celulă la alta prin contact direct, prin intermediul pililor sexuali.

Acest mecanism este extrem de important în economia transmiterii rezistenţei la antibiotice. Fenomenul este cunoscut de aproape 50 de ani şi recunoaşte transmiterea rezistenţei multiple la antimicrobiene.

Cel mai tipic exemplu este acela al transferului de material genetic între germenii din familia Enterobacteriaceae. Materialul genetic transferabil constă în două seturi diferite de gene incluse în plasmide.

Primul set consta în "plasmidele R" care au rolul de a induce sinteza de enzime care inactivează antibioticul. Cel de-al doilea set, definit ca "Factorul de transfer al rezistenţei"(FTR) conţine genele necesare pentru conjugarea bacteriană.

BCU IAŞI / BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

Cele două tipuri de seturi sau plasmide pot exista independent sau se pot combina formând "Factorul R complex", care poate fi diseminat prin conjugare bacteriană.

Multe dintre genele care mediază rezistența la antibiotice sunt identificate la nivelul plasmidelor şi al transpozonilor. Plasmidele conjugate transportă determinanții rezistenței care transferă rezistența numai la germenii gram-negativi sau numai la cei gram-pozitivi.

Transpozonii sunt elemente mobile, transpozabile, care pot "sări" dintr-un loc într-altul în genomul bacterian sau al ADN-ului plasmidic: de la plasmidă la plasmidă, de la plasmidă la cromozom bacterian, de la cromozomul bacterian la plasmidă.

Transpozonii conjugabili sunt elemente autotransmisibile care în mod normal sunt integrate în structura unui cromozom sau a unei plasmide dar care se pot autoexclude din aceste structuri şi prin conjugare se pot transfera pe un alt receptor. Transpozonii sunt elemente extrem de eficiente în transferul rezistenței bacteriene la substanțe antimicrobiene, cu posibilitatea de diseminare rapidă şi largă, la un mare numar de bacterii gazdă, înrudite sau nu.

Aceştia transmit rezistența pentru un singur antibiotic cum ar fi sinteza TEM-1-β-lactamaza purtată de transpozonul Tn3, rezistența la kanamicina purtată de transpozonul Tn5 etc.

Transferul genetic prin conjugare se manifestă mai ales la bacilii gram-negativi şi rezistența se instalează rapid, într-o singură treaptă.

Enterococii conțin un numar mare de plasmide care sunt purtătoarele unui larg si diferit spectru de gene care conferă rezistență multiplă la substante antimicrobiene.

Aceste plasmide sunt implicate în transferul rezistenței la antibiotice la nivelul altor specii bacteriene, fie ele gram-negative sau gram-pozitive.

Un alt mecanism prin care plasmidele şi transpozonii achiziționeaza noi informații genetice referitoare la rezistența împotriva acțiunii substanțelor antimicrobiene este bazat pe existența integronilor.

Integronii sunt elemente care conțin determinanții genetici ai unei informații alaturată unui determinant al recombinării unui situs specific din genomul bacterian. La nivelul lor se formează "casete genice mobile" care codifică un anume mecanism al rezistenței la antibiotice şi dețin în acelaşi timp şi informația necesară recombinării la nivelul situsului genei respective. La nivelul unui integron se pot insera mai multe casete ceea ce conferă acestuia proprietatea de a transporta şi difuza rezistența multiplă la substanțe antibacteriene.

Casetele genice nu se pot exprima direct, ele sunt dependente de integrarea lor în structura unui integron care are capacitatea de a le aranja sau recombina în funcție de necesitățile bacteriei. Astfel ordinea casetelor rezistenței este determinată de contactul bacterian cu antibiotice. Atunci când contactul cu un anume antimicrobian nu mai este actual, caseta specifică este mutată. Situsul principal este preluat de caseta care posedă informația referitoare la pericolul prezent în mediul celular. Nivelul rezistenței este maxim față de un anume antibiotic atunci când gena specifică acestuia se găseşte situată în prima casetă.

Integronii au fost descoperiți în anii '80 dar existența lor este mult anterioară erei antibioticelor. Se consideră că au apărut ca elemente ale rezistenței naturale în cadrul fenomenului de competiție microbiană. Originea lor este greu de stabilit datorită varietății largi de gene aflate la nivelul lor. S-a facut o corelație teoretică între gena rezistenței la antiseptice, qacE şi prima casetă genică mobilă, identificată ca fiind purtătoarea rezistenței la sulfonamide.

De atunci au fost caracterizate peste 50 de casete genice şi numărul lor este în continuă creştere. Au fost identificate gene care codifică rezistența pentru oxacilină prin sinteza de oxacilinază codificată de oxa20, gena arr-2 pentru blocarea acțiunii rifampicinei etc.

Conjugarea poate avea loc la nivelul tractului intestinal între microorganismele patogene şi cele saprofite. Fenomenul este extrem de important având în vedere că antibioticele exercită o

ROMANIAN-AMERICAN UNIVERSITY LIBRARY

presiune selectivă puternică asupra acestora. Unele studii evidențiază rolul bacteriilor cu habitat intestinal de rezervor al plasmidelor purtătoare de gene ale multirezistenței.

În unele grupuri populaționale peste 50% din persoanele testate au fost identificate ca purtătoare de germeni coliformi purtători de factori R. Asemenea bacterii au fost izolate și în apele reziduale fecaloid-menajere netratate. Practica terapeutică a demonstrat că utilizarea unui antibiotic este în directă relație cu gradul de rezistență a tulpinilor microbiene la acesta. Reducerea utilizării unui antibiotic este urmată de reapariția sensibilitatii la acesta mai ales dacă rezistența manifestată are drept mecanism transmiterea plasmidică. Fenomenul a fost observat în Islanda si Finlanda.

În același timp rezistența dobândită prin mutații cromozomiale este permanentă nefiind influențată de utilizarea sau nu a unui antibiotic.

Problemele care sunt de maximă actualitate se concentrază, cel puțin din punct de vedere practic, în jurul limitării diseminării în mediul comunitar a tulpinilor multirezistente specifice mediului spitalicesc. Putem aminti aici prezența din ce în ce mai frecventă în afara unitaților spitalicești a unor tulpini multirezistente de *Staphylococcus aureus* sau *Escherichia coli.* Aspecte noi ridică în momentul de față și tratamentul infecțiilor la indivizii imunodeprimați, cu germeni relativ avirulenți în condiții normale și care sunt natural rezistenți la multe antibiotice: *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Acinetobacter baumannii.*

Streptococcus pneumoniae prin patologia indusă și prin multiplele mecanisme care contribuie la dezvoltarea rezistenței la antibiotice este un exemplu de microorganism care devine o serioasă problemă de sănătate publică.

Controlul rezistenței microbiene față de antibiotice trebuie să conducă în primul rând la reconsiderarea strategiilor terapeutice care include și utilizarea antibioticelor precum și la menținerea florei bacteriene într-o stare cât mai apropiată de starea inițială de sensibilitate la antibiotice.

MODALITĂȚI DE EVIDENȚIERE A FENOMENULUI DE REZISTENȚĂ MICROBIANĂ

Metode clinice

Evaluarea clinică a eficacității tratamentului cu antibiotice într-o boală infecțioasă și implicit a sensibilității agentului microbian etiologic se bazează în principal pe amendarea fenomenelor morbide.

Această metodă trebuie considerată empirică atât timp cât ea nu poate furniza informații bazate pe evidențe științifice despre agentul patogen și despre comportamentul acestuia față de antibiotice. Trebuie avut în permanent în atenție că terapia infecției nu poate fi considerată sinonimă cu medicația etiotropă, fiind mult mai cuprinzatoare.

Metoda nu este utilă în studiul fenomenului de rezistență microbiană la substanțe antimicrobiene deoarece în procesul complex al tratamentului și vindecării intervin particularitățile pacientului, tratamentul adjuvant etc. care pot altera concluziile oricărei tentative de studiu.

Metode paraclinice (Antibiograma)

Obținerea unei terapii antimicrobiene eficientă și rațională, argumentată științific se bazează pe contribuția decisivă a laboratorului de microbiologie. Identificarea agentului etiologic și caracterizarea, inclusiv stabilirea sensibilității acestuia la medicația antimicrobiană sunt esențiale pentru succesul terapeutic.

O terapie antimicrobiană țintită presupune cunoașterea:

-agentului microbian responsabil de etiologia bolii;

-sensibilității acestuia la antibiotice;

-proprietăților farmacologice ale antimicrobienelor care vor fi administrate bolnavului;

-particularităților fiziologice sau patologice ale pacientului.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Antibiograma clasică permite cuantificarea relației microorganism – substanță antimicrobiană şi o defineşte calitativ şi semicantitativ.

O tulpină microbiană poate fi definită sau caracterizată, în raport cu o substanță microbiană, ca fiind:

-sensibilă: dacă concentrația minimă inhibitorie (CMI) este de minim 2-4 ori mai mică decât nivelul medicamentului în ser sau alte umori, în condițiile unor doze terapeutice lipsite de toxicitate sau alte efecte nedorite; efectul terapeutic este posibil;

-rezistentă: dacă CMI este mai mare decât nivelul medicamentului în ser sau în alte umori; efectul terapeutic nu este posibil din mai multe motive, cel mai important fiind acela al atingerii unor niveluri plasmatice toxice pentru obținerea efectului terapeutic dorit;

-intermediară sau moderat sensibilă: dacă CMI este apropiată de concentrația medicamentului în sânge sau alte umori. Efectul terapeutic este greu de anticipat, cu excepția unor antibiotice care permit concentrații plasmatice mari, fără riscul apariției unor efecte toxice, cum sunt penicilina G şi antibioticele care se concentrează selectiv în anumite țesuturi.

Concentrația minimă inhibitorie (CMI) trebuie definită diferențiat, în funcție de natura testului, in vitro sau in vivo:

-in vitro CMI este definită ca fiind cea mai mică cantitate de substanță antimicrobiană care inhibă tulpina testată;

-in vivo CMI semnifică concentrația minimă de substanță antimicrobiană activă aflată în focarul de infecție care inhibă tulpina bacteriană.

Acest aspect este extrem de important deoarece atrage atenția asupra necesității atingerii concentrațiilor active de antimicrobian la nivelul focarului

Practica terapeutică a impus obținerea unui criteriu mult mai apropiat de realitate şi de nevoile clinicianului. Astfel s-a născut "punctul de ruptură al CMI", determinat in vitro. Punctele de ruptură se stabilesc empiric prin coroborarea unor factori farmacologici şi microbiologici:

1. factorii farmacologici:

-concentrația maximă a medicamentului în focarul de infecție şi timpul de înjumătățire a medicamentului. Se iau ca punct de referință valoarile sanguine, din rațiuni practice şi datorită dificultăților recoltării unor umori ale organismului;

-fracțiunea activă antimicrobiană după legarea la proteinele plasmatice diferă mult de la un antibiotic la altul;

-metaboliții cu activitate microbiană restantă diferă de la un medicament la altul.

2. factorii microbieni:

-punctul de referință uzual, CMI, este o mărime statică, în timp ce concentrația de medicament activ antimicrobian variază continuu în organismul bolnavului;

-distribuția CMI-urilor tulpinilor unei specii microbiene variază atât în timp cât şi pe zone geografice şi colectivități. De aceea punctele de ruptură sunt mai reproductibile când se plasează în zone cu evoluție plurimodală şi nu unică; acest lucru permite calcularea mai corectă, din punct de vedere statistic a punctelor de ruptură ale CMI;

-distribuția CMI variază între specii, ceea ce impune fie definirea tulpinii cel mai frecvent izolată ca agent etiologic, fie realizarea unor tabele cu punctele de ruptură pentru diferitele specii întâlnite;

-metoda "punctelor de ruptură ale CMI poate să nu fie operantă dacă avem de a face cu tulpini în care preexistă variante rezistente selectabile sau care produc enzime inductibile inactivatoare de antibiotic.

Buiuc propune, pe baza datelor din literatură, o formulă pentru estimarea punctelor de ruptură:

$$Punctul\_de\_ruptura\_al\_CMI = \frac{C_{max} \times f}{t \times e} \times S$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unde: C_{max} = concentrația sanguină maximă de substanță antimicrobiană activă atinsă după faza de distribuție inițială pentru o doză dată (de regulă după o oră); f = un factor de corecție pentru legarea medicamentului la proteine (<70% legare = 1,0; 70-90% legare = 0,5; >90% legare = 0,2); t = un factor de corecție pentru timpul de înjumătățire (< 1 oră = 2,0; 1-3 ore = 1,0; >3 ore = 0,5); e = factorul prin care C_{max} întrece CMI (de regulă de 4 ori); pentru a permite puncte de ruptură înalte legate de concentrarea ridicată a medicamentului în anumite situsuri sau doze crescute poate fi folosit factorul 1; S = factorul de modificare pentru a se obține reproductibilitatea maximă în raport cu CMI. Dacă S=1 nu se produce nici o modificare; când S<1 punctul de ruptură variază în jos, iar cînd S>1 variația este în sus.

Numai în mod excepțional modificarea produce puncte de ruptură mai mari ori mai mici de două ori decât cele calculate cu formula principală, dar aceasta presupune sacrificarea reproductibilității de laborator pentru relevanța clinică.

Succesul terapiei antimicrobiene depinde de utilizarea testelor de laborator, pentru ghidarea acestei terapii. În stabilirea terapiei antimicrobiene pot fi întâlnite trei situații:

-agentul etiologic este stabilit pe baza raționamentului clinic, al criteriilor de frecvență al agentului microbian în etiologia bolii, iar tratamentul antimicrobian urmează aceleaşi criterii de stabilire, mai ales pentru germeni care nu şi-au modificat sensibilitatea față de anumite antibiotice, cum ar fi de exemplu infecțiile streptococice cu streptococ betahemolitic de grup A, care este în continuare sensibil la penicilina G; acolo unde se bănuieşte implicarea unui germen cu susceptibilitate modificată, criteriul de alegere al antibioticului este cel al rezistenței minime cunoscute față de un antibiotic sau, dacă starea bolnavului o cere se apelează la antibioticele de rezervă. Antibiograma indică susceptibilitatea tulpinii microbiene izolate la antibiotice iar clinicianul decide, în funcție de evoluția bolii şi de starea bolnavului, dacă modifică sau nu terapia antimicrobiană instituită;

-agentul infecțios este depistat prin tehnici rapide, microscopic sau antigenic, dar nu se stabileşte susceptibilitatea față de antibiotice; în această situație se procedează ca la punctul a.

-agentul infecțios a fost izolat şi identificat şi a fost stabilit spectrul său de sensibilitate la antibiotice, prin antibiogramă sau prin altă metodă.

Determinarea sensibilității germenilor la substanțe antimicrobiene se poate efectua prin mai multe metode care, in general pot fi clasificate în: metode clasice, calitative şi cantitative şi metode moderne, genetice.

Metode calitative

Metodele calitative de determinare a sensibilității microbiene la antibiotice au la bază antibiograma difuzimetrică. Aceasta este cea mai utilizată metodă în prezent în lume datorită simplității ei.

Metoda este recomandată de OMS şi este standardizată, ceea ce permite, cu condiția respectării protocoalelor de lucru, reproductibilitatea rezultatelor şi compararea acestora.

Metoda constă în plasarea unor discuri impregnate cu cantități cunoscute de antibiotic în plăci cu agar Mueller-Hinton, însămânțat cu un inocul bacterian standardizat. După incubația necesară se observă şi se măsoară zonele de inhibiție a dezvoltării tulpinii microbiene testate şi se notează, pe baza unor tabele , categoriile de sensibilitate: sensibil, intermediar, rezistent.

Dezavantajele sunt că nu este indicat CMI sau CMB, că rezultatul poate fi viciat prin greşeli de tehnică, de citire, degradarea discurilor etc.

Metode cantitative

Metodele cantitative se bazează pe determinarea concentrațiilor de antibiotic care inhibă dezvoltarea tulpinii izolate în prelevatul analizat. Dintre aceste metode amintim determinarea CMI, determinarea activității bactericide, testarea activității antibioticelor asociate etc.

Determinarea concentrației minime inhibitorii permite determinarea *in vitro* a gradientului de antibiotic care inhibă dezvoltarea tulpinii microbiene testate, fie în plăci cu mediu solid agarizat, fie în tuburi cu bulion nutritiv.

Indicația majoră a acestei tehnici este determinarea cantitativă a nivelului de sensibilitate al tulpinii testate pentru un anumit antibiotic, în unele boli infecțioase unde conducerea tratamentului presupune cunoașterea cât mai precisă a acestor valori, cum ar fi de exemplu, endocardite bacteriene, osteomielite etc.

Metoda este extrem de utilă și pentru caracterizarea corectă a tulpinilor încadrate ca "intermediare" cu teste calitative. Metoda își găsește aplicabilitate și în supravegherea epidemiologică a fenomenului de rezistență microbiană la antibiotice.

Determinarea CMI se poate face prin mai multe tehnici: tehnica diluțiilor în agar; tehnica diluțiilor în bulion; tehnica punctelor de ruptură; testul E (Epsilometer test).

Tehnicile bazate pe "diluție" sunt costisitoare, necesită timp dar au avantajul unor informații precise, sunt reproductibile pentru tulpina izolată.

Ceva mai nouă este tehnica "punctelor de ruptură" care permite, în pofida absenței informației despre gradientul inhibitor, realizarea rapidă a testului, automatizată.

În ultimii ani a apărut testul E (E-test) care combină simplitatea testării difuzimetrice cu acuratețea testării cantitative. Pe benzi de material inert este fixat un gradient exponențial de antibiotic, cu 15 diluții și cu echivalentul lor în CMI. Aceste benzi sunt dispuse radiar pe suprafața unei plăci cu mediu agarizat în care a fost însămânțată, în condiții standardizate, tulpina de analizat. După incubarea corespunzătoare, CMI este indicată de intersecția dintre zona eliptică de inhibiție a culturii și scala de gradiente a benzii. Deși prețul de cost este relativ ridicat, avantajele oferite fac din acest test un mijloc simplu și eficient de evaluare a susceptibilității tulpinii testate la antibiotice. Determinarea activității bactericide, respectiv a concentrației minime bactericide (CMB) are drept scop stabilirea concentrațiilor de antibiotic care în 24 de ore omoară în proporție de cel puțin 99,9% bacteriile din inocul. Metoda este utilă în conducerea tratamentului antimicrobian în infecții severe, infecții localizate în situsuri greu accesibile antibioticelor cum este cazul osteomielitelor, endocarditelor etc.

O metodă care ar fi extrem de utilă dacă ar intra în practica curentă este testarea față de antibiotice asociate, în condițiile în care monoterapia cu antibiotice este din ce în ce mai rară. Efectul unei asocieri de antibiotice nu este intotdeauna cel urmărit de clinician, din care cauză evaluarea eficacității unei asocieri de antibiotice se impune.

Metode genetice

În afara metodelor expuse mai sus, considerate clasice, în ultimele două decenii ale secolului al XX-lea au fost create tehnici bazate pe metode genetice. Aceste metode au avantajul rapidității, pof fi executate direct pe specimenul recoltat de la bolnav, elimină toate inconvenientele legate de cultivarea, izolarea și identificarea prin metode clasice a agentului microbian.

Dezavantajele metodelor genetice sunt legate de identificarea germenelui dacă acesta se află în număr redus în prelevat, de necesitatea unor tehnici specifice pentru anumite antibiotice; existența mai multor fenotipuri bacteriene într-un prelevat poate genera rezultate eronate.

Dintre aceste metode pot fi amintite: detecția genelor rezistente la anumite antibiotice prin tehnici PCR, amplificarea sau secvențierea ADN-ului bacterian, idntificarea mutantelor de rezistență la antibiotice.

Indiferent de metoda utilizată, antibiograma nu este un "ordin de prescriere a antibioticelor" ci numai un rezultat de laborator util pentru orientarea tratamentului.

Balș subliniază că "nici o analiză nu este mai des cerută, în mod abuziv, fără nici o justificare logică" ceea ce de cele mai multe ori duce la instituirea unor tratamente inadecvate.

Antibiograma este extrem de utilă, chiar indispensabilă dacă este cerută și executată corect, este interpretată "critic" și dacă "nu i se cere mai mult decât poate da".

BCUMS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 5

SUBSTANȚE ANTIMICROBIENE UTILIZATE ÎN TERAPIA ŞI PROFILAXIA INFECȚIILOR

ANTIBIOTICE ŞI CHIMIOTERAPICE ANTIMICROBIENE

Antibioticele (AB) şi chimioterapicele antimicrobiene reprezintă un grup de medicamente capabile să suprime dezvoltarea şi multiplicarea unor microorganisme şi chiar să le distrugă. Antibioticele sunt substanțe antimicrobiene produse de diferite specii de microorganisme (bacterii, fungi, actinomicete) care posedă proprietăți bactericide sau bacteriostatice. Astfel penicilinele şi cefalosporinele sunt extrase din ascomicete (fungi din genul Penicillium). Aminoglicozidele, macrolidele, tetraciclinele, cloramfenicolul, lincomicinele sunt extrase mai ales din actinomicete (genul Streptomyces). Unele bacterii din genul Bacillus produc polimixinele şi bacitracina.

Chimioterapicele antimicrobiene sunt substanțe chimice preparate prin sinteză şi sunt alăturate grupului antibioticelor datorită efectelor similare acestora.

În momentul de față, delimitarea netă a acestor două catogorii de substanțe antimicrobiene utilizate în terapeutică nu mai este nici posibilă şi nici justificată. Datorită progreselor ştiințifice şi tehnologice multe dintre aceste substanțe sunt obținute industrial prin sinteză sau semisinteză chimică. Obținerea unui produs terapeutic antimicrobian pe cale biologică, prin extracție sau prin sinteză industrială este dictată doar de rentabilitatea metodei.

Din aceste motive ne însuşim punctul de vedere al dl. Prof Angelescu şi vom folosi termenul de antibiotic pentru toate substanțele terapeutice cu acțiune antimicrobiană iar pentru a defini utilizarea lor în practica medicală vom folosi termenul de antibioticoterapie.

Delimităm termenul de antibiotic de substanțele cu acțiune antivirală, antiparazitară şi de substanțele dezinfectante.

Clasificare

Antibioticele sunt clasificate după mai multe criterii fără ca nici unul dintre acestea să fie exhaustiv.

Cele mai cunoscute criterii de clasificare se bazează pe: finalitatea acțiunii, structura chimică, spectrul de acțiune.

Antibioticele acționează asupra microorganismelor selectiv. Acest concept trebuie înțeles în sens relativ, eficacitatea unui antibiotic fiind dependentă de mai mulți factori: caracteristicile microorganismului, particularitățile organismului gazdă, efectul medicamentului în organism.

Mecanisme de acțiune

Principalele mecanisme prin care substanțele antimicrobiene acționează asupra organismului sunt:

-blocarea sintezei peretelui celular bacterian (peniciline, cefalosporine, vancomicina, bacitracina, imidazolii);

-alterarea permeabilității membranei celulare (polimixina, colistinul, antifungice polienice);

-inhibarea subunităților ribozomale 30S sau 50S cu blocarea reversibilă a sintezei proteinelor (cloramfenicolul, tetraciclinele, macrolidele);

-blocarea unității ribozomale 30S cu alterarea ireversibilă a sintezei proteinelor bacteriene (aminoglicozide);

-afectarea metabolismului acizilor nucleici prin inhibarea ARN polimerazei ADN dependentă (rifampicina) sau prin inhibarea ADN girazei (chinolonele);

-blocarea unor mecanisme metabolice (antimetaboliți: sulfonamidele, trimetoprimul).

BCU "AS" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Blocarea sintezei peretelui celular bacterian

Bacteriile sunt clasificate în bacterii grampozitive şi bacterii gramnegative în funcţie de tinctorialitatea lor faţă de coloraţia Gram şi care se datorează structurii diferite a peretelui bacterian.

Bacteriile grampozitive au peretele celular alcătuit din peptidoglican, acid teichoic sau acid teichuronic.

Peretele bacteriilor gramnegative este mai complex din punct de vedere structural, fiind alcătuit din peptidoglican, lipopolizaharide, lipoproteine, fosfolipide şi proteine.

Antibioticele care acţionează prin acest mecanism sunt β-lactaminele (peniciline, cefalosporine, carbapenemi, monolactaminele), vancomicina şi bacitracina.

Antibioticele care acţionează prin blocarea sintezei peretelui bacterian acţionează în fapt la nivelul sintezei stratului de peptidoglican. Stratul de peptidoglican are rol în menţinerea formei celulare şi a rezistenţei celulare mai ales la germenii grampozitivi, permiţându-le să reziste in mediul hipoton.

Sinteza peptidoglicanului cunoaşte mai multe etape: in prima etapă are loc sinteza precursorilor de peptidoglican sau a subunutăţilor de peptidoglican, proces care se produce la nivelul citoplasmei. Unele antibiotice cum ar fi fosfomicina şi cicloserina blochează unele enzime cum ar fi D-alanil-D-alanin- sintetaza care are afinitate mai mare pentru antibiotice decât pentru D-alanina care intră în componenţa peptidoglicanului.

În etapa a II-a are loc polimerizarea subunităţilor precursoare şi ataşarea acestora de peptidoglicanul deja existent în peretele bacterian. Procesul implică acţiunea unor transpeptidaze care au proprietatea de a lega penicilina şi sunt cunoscute sub numele de "proteine care leagă penicilina" PBP (penicillin-binding-protein). Sunt cunoscute 6 clase diferite de PBP care sunt diferit distribuite la germenii gram-pozitivi, gram-negativi şi la anaerobi.

Unele antibiotice acţionează selectiv, legându-se numai de anumite PBP. De exemplu, mecilinamul (amidino-penicilină) nu au afinitate pentru PBP bacteriilor gram-pozitive, aztreonamul se leagă doar de PBP bacteriilor gramnegative, monobactamii inhibă doar bacilii gram-negativi aerobi etc. Vancomicina, care nu este betalactamină, acţionează prin mecanism multiplu, la nivelul tuturor etapelor sintezei peptidoglicanului, inclusiv in faza de transport şi polimerizare la nivelul peretelui bacterian. Datorită acestui mecanism complex de acţiune vancomicina este un antibiotic extrem de valoros în tratamentul infecţiilor cu stafilococi şi enterococi rezistenţi la betalactamine.

Bacitracina interferă transportul subunităţilor de peptidoglican la nivelul peretelui bacterian al celulei în creştere.

Antibiotice care acţionează la nivelul membranei citoplasmatice

Membrana citoplasmatică acţionează ca o barieră selectivă participând activ la transportul apei, ionilor, substanţelor nutritive şi controlând compoziţia mediului intracelular. Membrana este o structură lipidică bistratificată, străbătută de proteine globulare distribuite la întâmplare.

Există antibiotice care pot interfera cu funcţiile membranei citoplasmatice. Acestea pot fi definite ca agenţi cationici, anionici sau neutri. Cel mai bine cunoscut mecanism de acţiune este acela al polimixinei B şi al polimixinei E.

Ele acţionează competitiv cu cationii de Mg^{2+} şi Ca^{2+} pe care îi înlocuiesc din grupările fosfat ale lipidelor din componenţa membranei, proces care este urmat de dezorganizarea membranei, alterarea permeabilităţii acesteia şi ieşirea din celulă a cationilor şi aminoacizilor. Datorită toxicităţii lor polimixinele au o întrebuinţare extrem de redusă şi mai ales în tratamente topice. În tratament oral colistina este indicată în infecţii digestive cu germeni sensibili, cu menţiunea că nu se absoarbe. Polimixinele nu au acţiune pe bacteriile gram-pozitive.

Antibioticele polienice au acțiune specifică la nivelul membranei fungilor care se deosebește de cea a bacteriilor prin conținutul ei în steroli.

Antibioticele polienice sunt alcătuite dintr-un segment hidrofob și unul hidrofil. La nivelul membranei fungice din interacțiunea cu polienele se formează un complex "membrană-polienă" la nivelul căruia se produc: acidifierea mediului, pierderea de K^+ și de glucide din structura agentului infecțios, urmate de moartea celulară.

Amfotericina B este singurul reprezentant al acestei clase de antibiotice cu utilizare sistemică. Alte antibiotice cum ar fi nistatina sunt numai de uz topic.

Tot la nivelul membranei citoplasmatice acționează și imidazolii (miconazol, ketoconazol, clotrimazol, fluconazol) care interferă sinteza membranelor lipidice ale fungilor, mai precis ele inhibă formarea ergosterolului din structura membranelor dar pof acționa și direct pe membrană pe care o pot leza.

Inhibiția sintezei acizilor nucleici

Antibioticele care interferă sinteza acizilor nucleici acționează la diferite nivele ale acestui proces extrem de complex. Unele pot inhiba sinteza nucleotidelor și interconversia lor; altele pot impiedica ADN să funcționeze ca matrice sau pot interfera cu acțiunea polimerazelor implicate în replicarea și transcripția ADN-ului bacterian.

Sinteza nucleotidelor este influențată de agenți terapeutici din clasa antifungicelor și a antiviralelor. Astfel flucitozina (5-fluorocitozina) este convertită la nivelul celulei fungice în 5-fluorouracil care inhibă timidilat sintetaza urmată de dificit de nucleotizi timinici și deficiențe în sinteza de ADN. Acyclovirul acționează ca un analog pentru nucleozide și transformat în trifosfat înhibă timidinkinaza și ADN polimeraza virusurilor herpetice. Zidovudina (AZT) acționează la nivelul reverstranscriptazei virusului imunodeficienței umane, blocând replicarea virală.

Clorochina și miracil D au capacitatea de a se intercala în structura ADN-ului microbian și de a inhiba sinteza unor noi lanțuri de acid nucleic, blocând creșterea și dezvoltarea plasmodiilor și respectiv a schistosomelor.

Inhibarea ADN-polimerazei-ADN dependentă este un mecanism prin care acționează rifampicina. Rifampicina realizează o legătură puternică la nivelul unei subunități a ARN-polimerazei care are rolul de a se fixa pe situsurile specifice ale ADN-ului, aceasta fiind urmată de blocarea polimerizării.

Un alt nivel la care antibioticele pot acționa este acela al inhibării replicării ADN-ului microbian. In replicarea acestuia un rol determinant îl au ADN-giraza și topoizomeraza I. Aceste enzime acționează împreună pentru a menține ADN-ul supraspiralat. ADN giraza are rolul de a controla supraspiralarea și despiralarea ADN-ului în timpul replicării cromozomilor bacterieni. Chinolonele au capacitatea de a se lega de complexul girază-ADN care se formează în cursul replicării ceea ce duce la blocarea sintezei acizilor nucleici și la moartea celulei. Noua generație de chinolone, fluorochinolonele, acționează la nivelul ADN-girazei si au un spectru larg antimicrobian, acțiunea lor fiind bactericidă.

Nitroimidazolii (metronidazolul) inhibă protozoarele și bacteriile anaerobe. Mecanismul de acțiune la nivelul germenilor anaerobi constă în reducerea medicamentului de către o enzimă specifică anaerobilor, ferrodoxina. Metabolitul astfel format are propietatea de a se lega de lanțurile de ADN pe care le fragmentează. Celulele mamiferelor nu sunt afectate deoarece ele nu conțin enzima transportoare și reducătoare a nitroimidazolilor.

Inhibarea sintezei de proteine

Antibioticele din acest grup acționează selectiv asupra ribozomilor bacterieni, inhibând sinteza proteinelor. Specificitatea acțiunii la nivel microbian se bazează pe faptul că ribozomii bacterieni sunt de tip 70S pe când cei ai mamiferelor sunt de tip 80S; Ribozomii bacterieni au două subunități, 30S și 50S care constituie ținta antibioticelor.

BUAM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acest mecanism de acțiune este specific mai multor agenți antimicrobieni, diferiți din punct de vedere structural: aminoglicozidele, tetraciclinele, cloramfenicolul, macrolidele, lincomicina.

Aminoglicozidele sunt din punct de vedere structural un zahar aminat atașat printr-o legătură glicozidică de un aglicon, care poate fi aminociclitol (oligozaharide) sau un diaminociclitol (aminoglicozide).

Primul aminoglicozid folosit în terapeutică a fost streptomicina, a cărei utilizare este practic de domeniul trecutului. Se mai folosește în tratamentul tuberculozei. Streptomicina acționează la nivelul subunității ribozomale 30S unde se leagă de proteina 12S, ceea ce duce la "citirea eronată" a codului genetic de către ribozom. Aminoglicozidele mai noi, gentamicina, tobramicina, amikacina, se leagă în plus și de proteina L6 a subunității ribozomale 50S. Acest lucru are o semnificație deosebită mai ales la bacteriile care dezvoltă rezistență prin blocarea acțiunii antibioticului la nivelul unei din subunitățile ribozomale. Aceasta se produce cel mai frecvent prin deleția proteinei 12S de la nivelul subunității 30S.

Aminoglicozidele acționează și la alte nivele ale sintezei proteinelor. Ele blochează activitatea complexului de inițiere pentru formarea peptidelor (ARN mesager + formilmetionină + ARN de transfer).

Aminoglicozidele pot induce "citirea eronată" a informației purtată de ARN-ul mesager ceea ce duce la inserția unor aminoacizi necorespunzători și sinteza unor proteine nefuncționale.

Spectinomicina este structural inrudită cu aminoglicozidele aminociclitol) care se leagă la nivel ribozomal de o proteină diferită și are acțiune bacteriostatică.

Tetraciclinele acționează la nivelul subunității 30S prin blocarea atașării aminoacil-ARN de transfer de ribozom și inhibarea sintezei proteinelor. Mecanismul este blocat reversibil de către antibiotic, ceea ce explică efectul bacteriostatic al acestuia. Acțiunea tetraciclinelor se extinde și asupra clamidiilor și micoplasmelor.

La nivelul subunității 50S acționează trei clase de antibiotice: cloramfenicolii, macrolidele și lincosamidele.

Cloramfenicolul este un antibiotic cu acțiune bacteriostatică activ atât pe germenii gram-pozitivi cât și pe cei gram-negativi. Blochează peptidiltransferaza, ceea ce împiedică formarea legăturilor peptidice la nivelul subunității ribozomale 50S.

Macrolidele acționează prin inhibarea sintezei ribozomale la nivelul subunității ribizomale 50S de care se leagă și blochează reacțiile de transpeptidare și de translocație. Acțiunea lor este bacteriostatică dar în concentrații înalte pot avea acțiune bactericidă. O particularitate este concentrarea lor de o sută de ori mai mult în bacteriile gram-pozitive față de cele gram-negative. Eritromicina este reprezentantul clasic al acestei clase de antibiotice, fiind caracterizată de un spectru larg, mai ales germeni gram-pozitivi, dar fiind activă și pe specii gram-negative cum ar fi *Haemophylus, Mycoplasma, Chlamydia și Legionella.* Noile macrolide, azitromicina și claritromicina, sunt mai active decât eritromicina, având însă același spectru de acțiune.

Lincosamidele, dintre care clindamicina s-a impus în practica terapeutică, acționează prin același mecanism ca și macrolidele.

Inhibarea unor mecanisme metabolice (antimetaboliții)

Acest mecanism este specific sulfamidelor și trimetoprimului.

Sulfamidele sunt derivați de acid paraaminobenzoic (paraaminobenzen sulfonamida) iar trimetoprimul este un compus diaminopirimidinic. Acidul paraaminobenzoic este un factor de creștere bacteriană. Sulfamidele acționează ca analogi structurali ai acidului paraaminobenzoic, astfel încât este blocată utilizarea acestuia la sinteza acidului folic. Sulfamidele substituie acidul paraaminobenzoic, formarea acidului dihidropteroic, precursor al acidului folic, este blocată. Acidul folic este utilizat de celula bacteriană la sinteza purinelor, a proteinelor.

Trimetoprimul acționează prin blocarea reducerii dihidrofolatului în tetrafolat.

Datorită sinergismului acțiunii lor trimetoprimul a fost asociat cu o sulfamidă, sulfametoxazolul, formând un compus antimicrobian eficace, cel puțin la început, cotrimoxazolul. Selectivitatea acțiunii acestor substanțe este dată de capacitatea celulei mamifere de a asimila acidul folic din surse exogene spre deosebire de celula microbiană care trebuie să-l sintetizeze.

Trimetoprimul nu înhibă dihidrofolat reductaza umană decât în concentrații extrem de mari.

Administrarea antibioticelor

Administrarea antibioticelor trebuie să țină cont de principiile pe care M.G. Balş le-a formulat:

-să se administreze numai antibiotice active pe germenii incriminați;

-antibioticele nu sunt active pe țesuturi devitalizate, necrozate, puroi, sfacele;

-nu scad febra postoperatorie, din neoplasme, de natură centrală, din viroze;

-antibioticele nu au acțiune pe virusuri, nu previn suprainfecțiile bacteriene;

-infecțiile locale (cu puroi, sfacele, necroze) şi din cavitățile naturale nu pot fi asanate complet numai prin antibioticoterapie; este necesar tratamentul local, chirurgical, de drenare şi aseptizare; antibioticele au în cele mai multe cazuri un rol adjuvant.

Având în vedere cele mai sus expuse momentul inițierii tratamentului antibiotic trebuie să țină cont de următoarele situații:

-în stări infecțioase grave instituirea tramentului antimicrobian se face imediat, pe criterii statistice de probabilitate (diagnostic clinic şi bacteriologic prezumtiv), urmând a fi reconsiderată ulterior;

-dacă tratamentul poate fi temporizat (infecții cu evoluție benignă sau comună), se vor aştepta şi alte date clinice şi paraclinice sugestive, precum şi confirmarea bacteriologică (pielonefrite, infecții urinare cronice etc.).

Alegerea antibioticului

Alegerea antibioticului trebuie să țină seama de următoarele reguli:

antibioticul ales trebuie să fie activ pe germenul responsabil de infecția în cauză; inițial alegerea antimicrobianului este bazată pe criterii de probabilitate, ulterior după obținerea datelor paraclinice şi în funcție de evoluția bolii acesta poate fi schimbat. In principal, ca principiu de bază antibioticul se schimbă doar dacă evoluția clinică şi datele de laborator indică ineficacitatea acestuia;

antibioticul trebuie ales în funcție de calitățile sale farmacologice (absorbție, repartiție şi difuziune în țesuturi, metabolism şi eliminare) şi de tipul şi localizarea infecției sistemică, digestivă, urinară, meningiană, osoasă). Aceste informații sunt esențiale în conduita terapeutică permițând clinicianului să monitorizeze tratamentul astfel încât la locul infecției să se realizeze concentrații eficiente de antibiotic. Monitorizarea se bazează pe determinarea concentrației minime inhibitorii sau a concentrației minime bactericide;

antibioticul ales trebuie să fie cît mai puțin toxic, cât mai bine tolerat şi să nu aibă contraindicații la pacientul tratat. Se evaluează starea generală a pacientului, existența unor stări fiziologice sau patologice particulare (sarcină, alăptare, diabet, neoplazii, stări alergice), tratamente asociate care influențează răspunsul pacientului la infecții (citostatice, radioterapie, corticoterapie etc.).

Asocierile de antibiotice

Asocierile de antibiotice reprezintă una dintre cele mai importante probleme ale utilizării acestor substanțe medicamentoase. Dificultățile constau în utilizarea judicioasă şi alegerea acelor asocieri optime fiecărui caz în parte. Regula generală în utilizarea antibioticelor este aceea a monoterapiei, cu tratament țintit, utilizându-se un antibiotic cu spectru cât mai îngust. Cu toate acestea există situații în care se impune asocierea de antibiotice. Aceste situații sunt:

RCUNIVERSITY CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- septicemii, endocardite bacteriene, bronhopneumonii grave, empieme, peritonite, meningite otogene cu etiologie multiplă sau generate de germeni multirezistenți la antibiotice; asocierea se face în scopul acoperirii cât mai largi a spectrului bacterian; se recomandă până la obținerea rezultatelor microbiologice (antibiograma) care permit un tratament țintit;

- tratamentul tuberculozei necesită utilizarea unor asocieri de antibiotice cu efect bactericid;

- tratamentul supurațiilor cronice (pulmonare, osoase, profunde) inabordabile chirurgical, în scopul sterilizării focarelor și în măsura în care este posibilă, împiedicarea apariției mutantelor microbiene rezistente la tratament;

- profilaxia infecțiilor la pacienți cu risc înalt de infecție cu germeni de spital sau cu etiologie multiplă (imunodeprimați, tratamente cu imunosupresoare, intervenții chirurgicale laborioase, politraumatizați etc).

Insuccesul în tratamentul antimicrobian

Insuccesul în tratamentul antimicrobian intervine atunci când cel puțin unul din factorii enumerați mai jos se manifestă:

agentul microbian manifestă o virulență mare sau este rezistent la antibioticul utilizat sau dezvoltă forme L sau persisteri;

diagnosticul de laborator microbiologic a fost viciat de prelevarea, transportul sau prelucrarea incorectă a probelor biologice;

starea generală sau particularitățile bolnavului, evoluția bolii sau a afecțiunilor asociate nu permit realizarea tratamentului adecvat sau pun organismul în imposibilitate de a răspunde adecvat la tratament;

tratamentul antimicrobian nu este inițiat și condus corect din punct de vedere al regulilor generale ale antibioticoterapiei. Astfel, eludarea diagnosticului microbiologic, indicații nejustificate din punct de vedere al etiologiei bolii, ignorarea proprietăților farmacologice ale antibioticului, dozarea greșită și o posologie incorectă sunt dintre cele mai frecvente cauze ale eșecului terapeutic și nu în ultimul rând al apariției tulpinilor multirezistente la antibiotice.

Suprainfecția microbiană

Terapia antimicrobiană are drept efect secundar distrugerea florei microbiene saprofită și comencală, localizată la nivelul mucoaselor orală, genitourinară și la nivelul tractului digestiv. Tratamentul are drept urmare selectarea florei microbiene rezistentă la antibioticul administrat. În aceste circumstanțe are loc o exacerbare a acestei flore cu invadarea segmentului anatomic respectiv și apariția semnelor de suprainfecție. Efectul este cu atât mai evident în serviciile clinice unde are loc selecționarea unei flore rezistente și multirezistente la antibioticele utilizate cu preponderență. De cele mai multe ori are loc o diseminare plasmidică a acestor germeni, unii dintre ei redutabili agenți parogeni, responsabili de patologia nosocomială: Enterococcus, Pneumococcus, Staphilococcus aureus, Salmonella, Serratia, Enterobacter etc. Problema este deosebit de importantă datorită aspectelor clinice, terapeutice și epidemiologice prezentate și este în centrul mecanismului infecțiilor nosocomiale.

Profilaxia cu antibiotice

Profilaxia cu antibiotice este un domeniu plin de abuzuri și controverse cu privire la utilitatea, în acest scop a tratamentului antimicrobian. Există indicații general acceptate ca esențiale, cum ar fi profilaxia malariei, a infecțiilor streptococice și a sindroamelor tardive post streptococice; indicațiile de necesitate sunt justificate de riscul unor izbucniri epidemice, cum ar fi epidemile de holeră, pestă, meningita meningococică etc.

În chirurgie, unde se practică cel mai frecvent profilaxia cu antibiotice, indicațiile sunt destul de controversate. Justificată este administrarea în: traumatisme craniene deschise, politraumatisme, fracturi deschise, arsuri, intervenții pe colon, intervenții ginecologice și urologice; chirurgia toracică și cardiovasculară sunt considerate ca indicații pertinente.

Studii clinice au demonstrat că profilaxia cu antibiotice este eficientă în unele situații și este inutilă dacă nu chiar dăunătoare în alte situații. Astfel Ebner și col. observă că

administrarea de antibiotice în vederea decontaminării tubului digestiv de flora microbiană nu are efectele scontate. Meier abordează profilaxia infarctului de miocard cu antibiotice, bazându-se pe supoziția că unele infecții cu Chlamydia pneumoniae la aterosclerotici cresc riscul de infarct de miocard. Studiul sugerează un oarecare efect protectiv al tratamentului cu fluorochinolone orale sau cu tetracicline, dar în concluzie administrarea profilactică în aceste cazuri nu este, după opinia autorului, recomandată. Analizînd eficiența antibioticoprofilaxiei în chirurgia cardiovasculară Harbarth şi col. observă că profilaxia prelungită cu antibiotice nu reduce rata apariției infecției la nivelul plăgii chirurgicale; în plus este raportată creşterea riscului de apariție a rezistenței microbiene la antibiotice.

Un studiu efectuat de Palmer şi colab. privind eficiența administrării profilactice a antibioticelor in practica stomatologică în Anglia relevă că într-o proporție semnificativă medicii stomatologi recomandă antibiotice în scop profilactic intr-un mod eronat, atât pentru proceduri chirurgicale cât şi pentru tratamente dentare comune. Se evidențiază că într-o proporție alarmantă, peste 60% din situații, recomandările se fac fără ca pacienții să prezinte nici cel mai mic risc de infecție sau antecedente infecțioase recente.

Analizând eficiența administrării profilactice a antibioticelor la pacienții în stare critică, pentru reducerea riscului de infectii pulmonare, D'Amico raportează efectele salutare în profilaxia infecțiilor pulmonare, cu o reducere semnificativă a ratei acestora. Interesant este că la pacienții în stare gravă, cu afectare pulmonară severă, adminstrarea de antibiotice nu reduce rata mortalității.

Profilaxia cu antibiotice poate fi aplicată în chirurgia colonului, unde riscul de infecții este înalt. În chirurgia generală unde se aşteaptă ca incidența infecțiilor să fie mai mică de 5%, antibioticele trebuie evitate. O motivație pentru administrarea profilactică a antibioticelor o constituie chirurgia implantelor cardiace, ortopedice, de organe.

Profilaxia cu antibiotice este recomandată şi chiar necesară la pacienții neutropenici şi imunodeprimați. La aceştia riscul infecțiilor oportuniste este extrem de ridicat. Profilaxia se face cu antibiotice bactericide, fungicide şi virustatice: betalactamine (peniciline semisintetice , fără sau cu inhibitori de betalactamaze, imipenem), aminoglicozide, glicopeptide, flourochinolone, antituberculoase, antifungice sistemice (Fluconazol, Ketokonazol, Amfotericină) antivirale (Acyclovir, Ganciclovir, Foscarnet).

Inutilitatea administrării profilactice a antibioticelor este susținută şi de Peled şi col. Studiul efectuat arată că administrarea profilactică a antibioticelor în chirurgia estetică şi reconstructivă este cvasiprezentă în pofida tuturor celorlalte măsuri luate pentru reducerea riscului de infecție. Autorii, conform experienței personale, consideră că anumite stări patologice, cum ar fi diabetul zaharat, hipertensiunea arterială sau tratamente cu steroizi nu influențează negativ rata infecțiilor post intervenție, în condițiile unei pregătiri preoperatorii corecte, iar tratamentul profilactic antibiotic este inutil.

Profilaxia cu antibiotice trebuie contraindicată în următoarele circumstanțe:

- suprainfecții bacteriene din cursul unor afecțiuni virale sau contaminări cu germeni diferiți;
- profilaxia de masă cu antibiotice, cu excepția unor situații deosebite: epidemii, dezastre;
- la pacienții care primesc tratament imunosupresor sau la persoanele imunodeprimate;
- "acoperirea cu antibiotice" în timpul actului chirurgical, indiferent de natura şi de amploarea acestuia;

DEZINFECTANTE ŞI ANTISEPTICE

Dezinfectantele şi antisepticele sunt substanțe care permit distrugerea sau inactivarea microorganismelor, aflate în/pe țesuturi vii (antisepticele) sau pe obiecte (dezinfectantele).

Spre deosebire de majoritatea antibioticelor, aceste substanțe antimicrobiene nu prezintă specificitate pentru microorganisme, afectând în egală măsură şi celulele eucariote.

Mecanismele de acțiune sunt în general nespecifice (tabelul I), implicând afectarea membranei celulare, a proteinelor citoplasmatice, a aparatului nuclear.

Tabel 2. Principalele mecanismele de acțiune ale dezinfectantelor și antisepticelor

LOCUL ACȚIUNII	SUBSTANȚA	MECANISMUL DE ACȚIUNE
Învelișul celular (perete, membrana externă)	Glutaraldehida	Legarea de proteine; scoaterea unor ioni din structuri (Mg^{2+}), eliberarea unor lipoproteine din structuri
Membrana citoplasmatică	Compușii cuaternari de amoniu Clorhexidina Fenolii	Alterarea membranei prin modificări ale straturilor fosfolipidice; Alterarea aminoacizilor; Alterarea sintezei lipidelor din structura membranei
Macromoleculele din structura celulară	Formaldehida Glutaraldehida	Legarea de proteine, de ADN și ARN
ADN-ul celular	Halogenii Oxidantele (peroxizii)	Inhibarea sintezei ADN-ului Ruperea punților aminice
Reacțiile oxidative	Halogenii Peroxizii	Oxidarea grupărilor tiol Formarea de radicali liberi ($^{\cdot}OH$) care oxidează grupările tiol în enzime și proteine; alterarea grupărilor tiol din proteine și enzime
Grupările tiol	Argintul și compușii săi	Interacțiunea Ag^{+} cu grupările tiol și alterarea structurii proteinelor și enzimelor

Eficacitatea dezinfectantelor și a antisepticelor se exprimă prin indicele fenolic (IF), adică raportul dintre concentația de fenol și cea de dezinfectant sau antiseptic care generează același efect antimicrobian (IF> 100 fiind considerat satisfăcător).

În general, o acțiune de tip antiseptic presupune un efect de inactivare a germenilor, iar printr-o acțiune de tip dezinfecție se urmărește un efect de tip litic asupra microorganismelor.

Se consideră că un antiseptic trebuie să inhibe o populație bacteriană în proporție de 99% iar un dezinfectant să distrugă germenii in proporție de 99,99%.

Definiții

Dezinfecția este acțiunea de distrugere și îndepărtare a marii majorități a microorganismelor de pe suprafețe și obiecte, din aer, apă, alimente etc. cu mențiunea expresă că în urma acțiunii propriu-zise pot rămâne anumite microorganisme, mai ales spori, care însă în condițiile date nu ar pune în pericol starea de sănătate a pacienților. Metoda se adresează celei de a doua verigi a procesului epidemiologic, căilor și mecanismelor de transmitere a infecției.

Dezinfecția folosește un complex de metode și mijloace (mecanice, fizice, chimice) menite de a îndepărta sau distruge agenții patogeni sau condiționat patogeni prezenți în mediu și care pot genera infecții.

Dezinfecția este profilactică atunci când se urmărește îndepărtarea unor eventuali germeni (potabilizarea apei, pasteurizarea laptelui, prelucrarea alimentelor, dezinfecția in unitățile sanitare, colectivități etc.) și "în focar", când acțiunea este îndreptată asupra unor germeni cunoscuți care sunt eliminați în mediu de către bolnavi sau purtători de germeni.

Eficacitatea dezinfecției este influențată de numeroși factori: felul și nivelul contaminării microbiene, timpul de expunere la dezinfectant și concentrația utilizată, temperatura ambiantă, interreacția dintre dezinfectant și suportul material pe care se aplică etc.

POLONI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Centers for Diseases Control (CDC) din Atlanta, SUA a adoptat definiţiile propuse de Asociaţia Profesioniştilor în Controlul Infecţiilor (Association of Professional in Infection Control):

- dezinfecţie de nivel înalt: distrugerea tuturor microorganismelor, cu excepţia sporilor unora dintre acestea;
- dezinfecţie de nivel mediu (intermediar): se inactivează majoritatea germenilor, inclusiv *Mycobacterium tuberculosis*, unele virusuri şi unii fungi, fără afectarea sporilor;
- dezinfecţie de nivel scăzut: poate distruge marea majoritate a bacteriilor, virusurilor şi fungilor dar nu are acţiune pe unii germeni rezistenţi în mediu, cum ar fi *Mycobacterium tuberculosis*;
- curăţarea: îndepărtarea diferitelor substanţe (praf, pământ, substanţe organice) de pe suprafeţe; se realizează utilizând apă, detergenţi, factori mecanici. Are rolul de a favoriza acţiunea substanţelor dezinfectante.

Antisepticele sunt acele substanţe cu acţiune antimicrobiană astfel condiţionate să poată fi folosite prin aplicare externă pe tegumente şi mucoase. Din punct de vedere structural dezinfectantele sunt extrem de variate. Pentru dezinfecţie sunt utilizaţi: alcooli, halogeni şi compuşi halogenaţi, aldehide, fenoli, compuşi cuaternari de amoniu, peroxidul de hidrogen etc.

Principalele dezinfectante şi antiseptice

Alcoolii

Alcoolul etilic şi alcoolul izopropilic sunt alcoolii care s-au impus în practică ca având o bună activitate dezinfectantă.

Alcoolii au o acţiune germicidă asupra bacteriilor, inclusiv asupra M.tuberculosis, asupra fungilor şi virusurilor.

Concentraţia optimă la care acţiunea lor este germicidă este între 60-90%. Mecanismul de acţiune cel mai probabil este acela al denaturării proteinelor.

Deoarece nu acţionează asupra sporilor nu este recomandată folosirea alcoolilor în locul sterilizării. De asemenea alcoolii nu au capacitatea de a pătrunde în structura materialelor cu structură organică densă, ceea ce îi face inutilizabili pentru dezinfecţia de nivel înalt.

Alcoolul izopropilic nu are acţiune asupra virusurilor hidrofile (ECHO, Coxsackie).

Utilizarea alcoolilor trebuie limitată la dezinfecţia termometrelor, a endoscoapelor din fibră optică, pentru dezinfecţia ocazională a stetoscoapelor, aparatelor de ventilat manual. Datorită volatilităţii lor alcoolii au o perioadă de contact scurtă cu agenţii infecţioşi şi nu au remanenţă pe suprafeţele unde au fost aplicaţi. Efectul este mult mai bun dacă se procedează la imersia în alcool a obiectului ce trebuie dezinfectat.

Aldehidele

Formaldehida

Formaldehida este folosită atât ca dezinfectant cât şi ca sterilizant chimic, în stare lichidă sau gazoasă.Forma cea mai utilizată este soluţia apoasă de 37% formaldehidă bază, cunoscută şi sub numele de formalină.

Formalina are un bun efect germicid care se manifestă pe toate clasele de microorganisme: bacterii, virusuri, fungi, spori; este activă pe bacilul Koch. Ea inactiveză microorganismele prin alchilarea grupărilor amino- şi sulf-hidril ale proteinelor şi ale bazelor purinice.

Datorită toxicităţii sale sunt necesare măsuri de precauţie în utilizarea ei, ştiindu-se că formaldehida este potenţial carcinogenă.

Formaldehida are un rol foarte important în prepararea vaccinurilor virale, prin capacitatea ei de a inactiva tulpinile vaccinale.

Formaldehida a fost folosită pe scară largă la dezinfecţia/sterilizarea echipamentelor folosite în hemodializă dar, după demonstrarea proprietăţilor carcinogene, utilizarea în acest scop a fost mult redusă; acelaşi lucru s-a întâmplat şi în cazul dezinfecţiei altor echipamente.

RCUAIS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu rezultate asemănătoare, formaldehida poate fi înlocuită cu glutaraldehida, substanțe clorigene, acid peracetic.

Glutaraldehida

Glutaraldehida este o dialdehidă saturată utilizată pe scară largă ca sterilizant şi ca dezinfectant sub formă de soluție apoasă a obiectelor din metal, sticlă, cauciuc sau material plastic. Soluția preparată inițial este acidă şi nu are proprietăți sporocide. Pentru a se obține efectul maxim este necesar ca soluția să fie alcalinizată la un pH între 7,5-8,5. Soluția de glutaraldehidă gata preparată are o perioadă de utilizare destul de lungă, între 14 şi 28 zile. Utilizarea glutaraldehidei este larg răspândită datorită proprietăților ei:

- excelentă activitate germicidă;
- îşi păstrează calitățile biocide în prezența substanțelor organice (de exemplu ser bovin în proporție de 20%);
- nu are acțiune corozivă asupra cauciucului, materialelor plastice; nu afectează calitățile endoscoapelor, termometrelor etc.

Acțiunea germicidă se produce prin alchilarea grupărilor sulfhidril, hidroxil, carboxil şi amino din structura microorganismelor. In urma acțiunii glutaraldehidei are loc alterarea structurii acizilor nucleici şi a sintezei proteinelor microbiene.

Studii clinice au evidențiat capacitatea soluției de glutaraldehidă de a distruge oochisturile de *Cryptosporidium* după 30-60 min de contact.

Un aspect important în utilizarea glutaraldehei este acela al asigurării unei concentrații minime eficiente.

Studii clinice au subliniat scăderea concentrației soluției de glutaraldehidă de la 2,4% la 1,5% în 10 zile de utilizare şi scăderea de la 1% la 0,27% în 4 zile de reutilizare. Aceste studii au stabilit concentrația minimă efectivă a soluției de glutaraldehidă la 1% dacă se urmăreşte obținerea unei dezinfecții de nivel înalt. Pentru a se evita orice risc se consideră sigură concentrația de 1,5% pentru inactivarea micobacteriilor.

Glutaraldehida îşi regăseşte utilizarea în spitale la dezinfecția de nivel ridicat a echipamentului medical: endoscoape, echipamente respiratorii, echipamente utilizate la dializa renală, la aparatele de anestezie etc.

Halogenii şi compuşii halogenați

Clorul şi compuşi clorinați

Hipocloriții au fost foarte mult utilizați ca dezinfectante datorită efectului germicid asupra unei game largi de microorganisme, datorită prețului scăzut de cost şi a acțiunii foarte rapide. Din păcate acțiunea lor corozivă supra obiectelor metalice, degradarea țesăturilor, şi acțiunea iritantă asupra mucoaselor, au limitat mult utilizarea lor.

Acțiunea germicidă este datorată acidului hipocloros ($HOCl^-$) şi este puternic influențată de pH-ul mediului. In mediul bazic puterea germicidă scade prin formarea de ion hipoclorit OCl^-.

Cloraminele sunt derivați cloruraţi ai sulfonamidelor aromatice. În practică s-au impus cloramina B (clorsulfamida B) şi cloramina T (clorsulfamida toluenului). Avantajul acetora față de hipocloriți este stabilitatea mai mare în mediu, cu prelungirea activității germicide.

Dicloroisocianuratul de sodiu condiționat sub formă de tablete este de asemenea un dezinfectant activ care eliberează clorul treptat, cu acțiune comparabilă cu cea a hipocloriților dar cu durată prelungită şi după unii autori chiar cu acțiune germicidă mai bună.

Mecanismul prin care clorul liber acționează asupra microorganismelor nu este încă elucidat. Se consideră că ar avea o acțiune de blocare a unor reacții enzimatice cu altererea peretelui celular, denaturarea unor proteine citoplasmatice şi inactivarea acizilor nucleici.

Iodul şi iodoforii

Efectul germicid al iodului se bazează pe capacitatea acestuia de a penetra prin peretele celular şi de a modifica structura proteinelor. Se descrie şi alterarea acizilor nucleici şi a acizilor graşi. Se descrie o rezistență naturală la acțiunea germicidă a iodului la virusurile cu

înveliş nonlipidic. La nivelul învelişului viral iodul atacă proteinele de suprafaţă şi destabilizează acizii graşi ai membranei prin reacţia cu legăturile nesaturate ale carbonului.

Mecanismul de acţiune al iodului este destul de puţin studiat şi cunoscut. Se presupune că iodul (I) penetrează rapid prin peretele celular şi acţionează la nivelul acizilor graşi şi al radicalilor liberi ai aminoacizilor, în particular cisteina şi metionina.

Iodul în soluţie apoasă sau alcoolică este rapid bactericid, fungicid, virulicid şi sporicid. Utilizarea iodului poate fi urmată de iritaţia şi de pătarea tegumentelor pe care s-a aplicat dezinfectantul. De asemenea trebuie ştiut că soluţia apoasă este instabilă din punct de vedere chimic.

Eliminarea acestor inconveniente în utilizarea iodului s-a obţinut prin crearea iodoforilor.

Iodoforii sunt definiţi ca acele combinaţii dintre iod şi diferitii agenţi solubilizanţi utilizaţi pentru prepararea diluţiilor şi care au rolul de a transporta şi elibera iodul activ. Trebuie menţionat că acţiunea fungicidă şi sporicidă a iodoforilor este mai scăzută decât a tincturii de iod.

Cei mai cunoscuţi şi utilizaţi iodofori sunt povidon-iodina şi poloxamer- iodina, o combinaţie a iodului cu polivinilpirolidona. Acest produs dar şi alţi compuşi compuşi cu iod păstrează proprietăţile germicide ale iodului dar sunt lipsiţi de efectele negative ale acestuia: toxicitatea, acţiunea iritantă asupra mucoaselor şi efectul coroziv asupra metalelor.

Agenţii oxidanţi

Peroxidul de hidrogen (apa oxigenată)

Datele din literatură certifică proprietăţile germicide ale apei oxigenate asupra tuturor claselor de microorganisme: bacterii, virusuri, fungi, spori, inclusiv bacilul Koch. Efectul apei oxigenate este potenţat dacă aceasta este asociată cu acidul peracetic.

Apa oxigenată este considerată un produs ecologic, utilizarea ei nefiind urmată de poluarea mediului înconjurător.

Mecanismul de acţiune se bazează pe proprietăţile oxidative ale apei oxigenate. La nivelul celulei se formează radicali liberi hidroxil (˙OH) care interferă cu structurile esenţiale ale celulei, proteine, lipide, acizi nucleici, pe care le alterează.

În general activitatea este mai intensă la nivelul bacteriilor grampozitive decât la cele gramnegative. Prezenţa în componenţa celulei a peroxidazelor poate creşte rezistenţa microorganismului la concentraţii mai mici de dezinfectant.

In concentraţie de 3-6% peroxidul de hidrogen este un dezinfectant eficace pentru suprafeţe, lentile de contact, echipament folosit în respiraţia artificială etc.

În concentraţie de 25% peroxidul de hidrogen demonstrează calităţi sterilizante, similare cu ale soluţiei de 2% de glutaraldehidă. Pentru exprimarea efectului sporicid este necesară o concentraţie în jurul a 30% şi un timp de contact mai îndelungat. Utilizarea este mult limitată datorită proprietăţilor corozive ale produsului şi a iritaţiei la nivelul mucoaselor pe care produce.

Acidul peracetic

Acidul peracetic sau acidul peroxiacetic în concentraţii mici de cca. 1g/l (0,001% pana la 0,2%) este caracterizat de o acţiune rapidă asupra microorganismelor, inclusiv asupra sporilor. Un avantaj extrem de important este acela că produşii de descompunere nu au efecte nocive sau toxice şi nu lasă reziduuri. Acţiunea dezinfectantă se păstrează şi în prezenţa substanţelor organice; de asemenea, acţiunea sporicidă se manifestă şi la temperaturi scăzute. Acidul peracetic, ca orice acid are acţiune corozivă, neajuns de poate fi diminuat prin modificarea pH-ului sau prin adăugarea unor aditivi.

Mecanismul de acţiune a acidului peracetic este identic cu al celorlalţi agenţi oxidanţi.

Asocierea acidului peracetic cu peroxidul de hidrogen este utilizată cu rezultate foarte bune în dezinfecţia componentelor reutilizabile ale dializoarelor. Acidul peracetic este utilizat şi în practica stomatologică. Acţiunea dezinfectantă este demonstrată asupra tulpinilor de Bacillus subtilis şi Clostridium sporogenes când soluţia este încălzită la 50^0C iar timpul de expunere

este de aproximativ 12 minute. Unele studii sugerează că activitatea antibacteriană a acidului peracetic este comparabilă cu a glutaraldehidei, mai ales asupra sporilor şi a micobacteriilor.

Fenolii

Fenolul a fost utilizat pentru proprietăţile sale bactericide încă din secolul trecut fiind introdus în practică de Lister.

În ultimii ani au fost studiate proprietăţile antimicrobiene ale unor derivaţi de fenol dintre care s-au remarcat pentru proprietăţile lor dezinfectante orto-fenilfenolul şi orto-benzil- para-clorfenolul. În concentraţie mare fenolii acţionează ca toxic protoplasmic şi alterează peretele celular.

Fenolii sunt cel mai frecvent utilizaţi în compoziţia unor detergenţi. Fenolii au acţiune bactericidă, fungicidă, virulicidă si micobactericidă.

Dintre compuşii fenolici triclorsanul şi hexaclorofenul s-au impus în practică. Triclorsanul are o acţiune particulară asupra bacteriilor grampozitive. Acţiunea asupra fungilor şi a bacteriilor gramnegative este influenţată de diverse asocieri care pot creşte sau diminua efectele germicide.

Compuşii cuaternari de amoniu

Substanţele surfactante (surfactanţii) au în structura lor două zone, una hidrofilă şi alta hidrofobă. În funcţie de sarcina electrică a grupării hidrofile surfactanţii sunt clasificaţi în cationici, anionici, nonionici şi amfolitici. Dintre aceştia compuşii cationici cuaternari de amoniu au demonstrat proprietăţi dezinfectante şi antiseptice. Primul produs introdus în practică, încă din 1935 a fost clorura de benzalkoniu, utilizat cu bune rezultate atât ca dezinfectant cât şi ca detergent. Din păcate activitatea este influenţată negativ de duritatea apei, prezenţa săpunurilor şi reziduurile anionice. Utilizarea ca antiseptic a clorurii de benzalkoniu a fost însoţită de apariţia unor infecţii nosocomiale, chiar manifestări epidemice. Din acest motiv Centers for Disease Control a recomandat scoaterea din uz ca antiseptic a compuşilor cuaternari de amoniu.

În afara primei generaţii cu reprezentantul ei clorura de benzalkoniu, se mai descriu alte două generaţii: generaţia a doua de compuşi cuaternari de amoniu, obţinută prin asocierea unui compus "etil-benzil-clorură" cu un compus "dimetil-benzil", ceea ce conferă persistenţa acţiunii dezinfectante şi în prezenţa unei ape extrem de dure. A treia generaţie de compuşi se caracterizează prin prezenţa a două lanţuri identice, cum ar fi dodecil-dimetil clorura de amoniu, introdusă în practică în 1965. Această structură permite păstrarea acţiunii germicide atât în prezenţa apei dure cât şi a reziduurilor organice.

Aceşti compuşi acţionează prin inactivarea unor enzime producătoare de energie, denaturarea proteinelor din compoziţia peretelui celular şi alterarea membranei celulare. Ei mai pot denatura fosfolipidele din componenţa membranei citoplasmatice, cu apariţia unor disfuncţii majore în transportul membranar şi ieşirea din celulă a unor compuşi esenţiali şi a unor ioni (K^+).

Compuşii cuaternari de amoniu sunt utilizaţi în principal pentru dezinfecţia spaţiilor spitaliceşti: pereţi, mobilier, pardoseli: Utilizarea lor este limitată de absenţa efectelor germicide asupra virusurilor hidrofile şi a bacilului Koch.

Biguanidele

Biguanidele introduse în practică sunt: clorhexidina, alexidina şi polimerii biguanidici, polihexametilen biguanida.

Clorhexidina

Clorhexidina este una dintre cele mai utilizate substanţe antimicrobiene, în particular ca antiseptic, dar şi ca dezinfectant. De asemenea sunt preparate produse medicamentoase cu rol antiseptic local care conţin şi clorhexidină. Datorită spectrului larg de acţiune pe bacterii, fungi şi virusuri, a efectului slab iritant la nivelul mucoaselor şi tegumentelor produsul este recomandat şi utilizat pe scară largă. Cu toate acestea efectele sunt influenţate în special de pH şi de prezenţa substanţelor organice.

La nivelul bacteriilor clorhexidina acționează prin lezarea membranei celulare externe (bacteriile gramnegative) sau a peretelui celular (bacterii gram-pozitive), ceea ce are drept urmare moartea celulei. Asupra fungilor produce liza protoplasmei celulare.

Clorhexidina nu este activă pe micoplasme şi nici pe sporii de Bacillus spp. dar este activă pe sporii care germinează, inhibând în mare parte dezvoltarea formelor vegetative. Activitatea antivirală a clorhexidinei este variabilă, activitatea ei fiind limitată la virusurile cu înveliş lipidic.

Clorhexidina nu are un efect semnifcativ pe fagii bacterieni, cum ar fi cei ai Pseudomonas aeruginosa.

Argintul şi compuşii argintului

Argintul şi compuşii săi sunt folosiți de mult timp şi cu rezultate bune în dezinfecție şi ca antiseptice, datorită calităților germicide ale argintului.

Cele mai utilizate sunt: nitratul de argint, acetatul de argint şi sulfadiazina argintului.

Nitratul de argint

Mecanismul de acțiune se bazează pe proprietea ionilor de argint de a interacționa cu grupările tiol (sulfhidril, ^{-}SH). Are loc o alterare a legaturilor aminoacizilor, mai ales ale cisteinei, ale L-metioninei şi ale compuşilor care conțin legături sulfhidrilice (tiosulfatul de sodiu, bisulfitul de sodiu). Ionul de argint, Ag^{+} se leagă de hidrogen, pe care-l blochează şi împiedică formarea unor compuşi esențiali metabolismului celular. De asemenea prezența Ag^{+} induce ieşirea din celulă a ionilor de potasiu, K^{+}. Acțiunea argintului se exprimă la nivelul proteinelor şi enzimelor celulare.

Nitratul de argint este utilizat ca antiseptic în profilaxia unor infecții oculare, în prevenirea infecțiilor şi suprainfecțiilor consecutive arsurilor şi pentru distrugerea verucilor, profilaxia infecției gonococice la nou-născut.

Protargolul şi colargolul pot fi utilizate ca antiseptice pentru tegumente şi mucoase în concentrații de 5-10% cu un efect slab bacteriostatic.

Utilizarea dezinfectantelor şi antisepticelor şi fenomenul de rezistență microbiană

Utilizarea produselor antimicrobiene numără printre efectele secundare şi apariția rezistenței microbiene.

Mecanismele rezistenței microbiene la dezinfectante sunt diferite pentru bacterii, fungi sau virusuri. Rezistența poate fi naturală sau dobândită.

Anderson şi col. au demonstrat în studiul lor că dezinfectantele folosite conform rețetei producătorului distrug în aceeaşi măsură atât enterococii vacomicino- sensibili cât şi enterococii-rezistenți. Autorii concluzionează că acțiunile de sanitație şi dezinfecție trebuie efectuate după protocoalele cunoscute, nefiind nici o legătură între rezistența la antibiotice şi cea la dezinfectante.

Intr-un alt studiu Rutala şi col. demonstrează acelaşi lucru investigând comportamentul unor tulpini de *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella choleraesuis şi Pseudomonas aeruginosa.*

Alte studii raportează aceleaşi rezultate şi susțin observația că fenomenul rezistenței microbiene la antibiotice nu este corelat cu rezistența microbiană la dezinfectante şi antiseptice.

Totuşi există şi autori care corelează rezistența la meticilină a unor tulpini de stafilococ cu rezistența acestora la clorura de benzalconiu. Aplicarea corectă a dezinfectantelor şi antisepticelor contribuie la impiedicarea dezvoltării infecțiilor intraspitalicești, şi mai ales a manifestării lor endemice si/sau epidemice, chiar in condițiile implicării în etiologia lor a unor germeni rezistenți sau multirezistenți la substanțe terapeutice antimicrobiene.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 6

SUPRAVEGHEREA, PREVENIREA SI CONTROLUL INFECTIILOR NOSOCOMIALE

DEFINIȚII ȘI CLASIFICARE

In țările anglo-saxone infecțiile nosocomiale (IN) sunt superpozabile conceptului de "hospitalism infecțios" care include și influența spitalizării asupra psihicului bolnavului.

Autorii francezi și americani delimitează conceptul la "infecția dobândită în urma spitalizării sau manevrelor diagnostice și terapeutice care nu era clinic manifestă și nic în incubație la momentul internării sau începerii asistării medicale".

In România conceptul de infecție nosocomială a cunoscut mai multe formulări. Cea mai actuală se regăsește în actul normativ emis de Ministerul Sănătății care reglementează activitatea de supraveghere și control a IN. Infecția nosocomială este definită "infecția contractată în spital sau alte unități sanitare cu paturi" și se referă la orice boală ce poate fi recunoscută clinicsau microbiologic, care afectează fie bolnavul datorită internării lui în spital sau îngrijirilor primite, fie ca pacient spitalizat sau în tratament ambulatoriu, fie personalul sanitar datorită activității sale, indiferent dacă simptomele bolii apar sau nu în timp ce persoana respectivă se află in spital".

Voiculescu definește IN ca infecția apărută sau contractată în spital, alta decât cea pentru care s-a făcut internarea.

Definirea IN se confruntă cu aspecte multiple, nu întotdeauna convergente, nu întotdeauna luate în considerație.

Definirea IN trebuie să țină cont de criterii clinice și de laborator.

O infecție este considerată "nosocomială" dacă apare și se manifestă în timpul spitalizării sau ca urmare a unei activități de îngrijire medicală.

Primul element care condiționează diagnosticul de "nosocomială" este este perioada de incubație. Dificultățile apar atunci când starea bolnavului la internare nu este foarte bine cunoscută, mai ales din punct de vedere a statusului infecțios al acestuia. Din acest considerent debutul unei infecții după 48 h de la internare poate fi considerat debutul unei infecții cu caracter nosocomial. Dar trebuie subliniat că acest element nu este definitor și se impune întotdeauna stabilirea relației cauzale între spitalizare și infecție.

Informațiile trebuie culese din datele clinice și din datele biologice. Datele clinice sunt derivate din observația directă a evoluției bolnavului și din analiza retrospectivă a evoluției bolii. Laboratorul este extrem de important prin datele pe care le furnizează și care obiectivează și dau suport științific observațiilor clinice. Culturile microbiene, identificarea antigenelor microbiene sau a anticorpilor specifici, identificarea unor structuri specifice etc. permit supravegherea circulației germenilor in unitățile medicale, identificarea tulpinilor rezistente la substanțele antimicrobiene etc.

Explorări paraclinice, radiologice, tomografia computerizată, rezonanța magnetică nucleară, biopsii contribuie la evaluarea statusului pacienților și la alegerea terapiei optime.

Există situații în care diagnosticul de internare este doar o supoziție și investigațiile ulterioare orientează către un alt diagnostic care include și existența unei infecții. Aici își regăsesc utilitatea explorarea paraclinică și de laborator ca și observarea directă, intraoperatorie.

Diagnosticul de IN se exclude dacă infecția este prezentă ca o complicație sau ca o extindere a unei infecții preexistente, mai puțin situația în care are loc o modificare a agentului patogen incriminat în boala inițială. De asemenea nu este considerată IN transmiterea transplacentară la nou născut a unor germeni: *Toxoplama gondii*, virusul rubeolic, virusul citomegalic, *Treponema pallidum*.

BCU INTERNATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

In definirea IN trebuie excluse şi următoarele noţiuni: colonizarea, definită ca prezenţa microorganismelor pe piele, mucoase, secreţii, care nu produce simptome sau semne clinice şi inflamaţia, aparută ca proces nespecific de apărare a organismului în urma acţiunii unor agenţi neinfecţioşi sau a unor leziuni traumatice de natură chimică sau fizică.

Din punct de vedere practic definirea IN după locul de apariţie şi eventuala patogenie este mult mai importantă.

Dintre numeroasele clasificări şi criterii de definire utilizate în timp cele elaborate de Centers of Diseases Control de la Atlanta (CDC) se pare că au întrunit cele mai largi sufragii.

CDC recunoaşte 13 categorii majore de infecţii nosocomiale după localizare. Pentru fiecare dintre acestea sunt detaliate criteriile de diagnostic şi de apariţie, fiind descrise 48 de tipuri de infecţie nosocomială.

Cele 13 categorii de IN se regăsesc şi în Ordinul M.S. nr.984/1994 şi sunt urmatoarele: 1) infecţia de plagă chirurgicală; 2) infecţia sanguină primară; 3) pneumonia; 4) infecţia tractului urinar; 5) infecţia osteoarticulară; 6) infecţia sistemului cardiovascular; 7) infecţia sistemului nervos central; 8) infecţia ochilor, urechilor, nasului, faringelui şi a cavităţii bucale; 9) infecţia aparatului digestiv; 10) infecţia tractului respirator inferior; 11) infecţia aparatului de reproducere; 12) infecţia pielii şi a ţesutului moale; 13) infecţia sistemică.

Infecţia de plagă chirurgicală poate avea următoarele aspecte:

- infecţie de plagă de incizie chirurgicală, caracterizată prin prezenţa de puroi sau de polinucleare modificate la nivelul inciziei chirurgicale sau între aponevroză şi piele, chiar şi în absenţa unui germen izolat;
- infecţia profundă de plagă chirurgicală presupune prezenţa de puroi sau de polinucleare alterate care apare la locul intervenţiei chirurgicale şi care este localizată în straturile şi ţesuturile subfasciale, la care se adaugă drenaj purulent sau dehiscenţa spontană a plăgii sau dechiderea de necesitate de către medic; mai poate exista abces profund în vecinătate dar a cărui apariţie poate fi corelată cu actul chirurgical sau este identificat in timpul actului chirurgical.

Infecţia urinară nosocomială recunoaşte 3 aspecte:

- bacteriuria asimptomatică, care pentru a fi diagnosticată trebuie trebuie să îndeplinească în principal următoarele criterii: absenţa oricăror semne clinice (febră, polachiurie, disurie, sensibilitate pubiană), două uroculturi pozitive (peste 10^5 colonii/ml urină) şi cu izolarea a cel mult două specii microbiene, în prima dintre ele, dacă pacientul nu a fost sondat permanent timp de 7 zile, înainte de recoltarea urinei. În situaţia când pacientul a fost sondat se consideră că avem de a face cu o bacteriurie asimptomatică nosocomială dacă în absenţa semnelor clinice urocultura este pozitivă, dar cu izolarea a cel mult două specii microbiene în urină.
- bacteriuria asimptomatică, presupune prezenţa unor semne şi simptome generale (febra) şi specifice aparatului urinar (polachiurie, disurie, sensibilitate suprapubiană) şi urocultură pozitivă, cu izolarea a cel mult două specii bacteriene iniţial. La aceste criterii, în funcţie de vârsta pacientului şi de patologia iniţială, se mai descriu: prezenţa piuriei, instituirea unor terapii antimicrobiene specifice, frotiuri din sediment urinar în care sunt evidenţiate microorganisme prin coloraţia Gram etc.
- alte infecţii ale tractului urinar în care sunt implicate cel puţin una din componentele anatomice ale tractului urinar, cu prezenţa de izolate microbiene, drenaje purulente, febră, probe paraclinice pozitive.

Pneumonia nosocomială este definită separat de celelalte infecţii ale tractului respirator inferior. Criteriile includ combinaţii diferite ale elementelor de diagnostic clinic, radiologic şi de laborator. În principal pacientul prezintă raluri sau matităţi la examenul clinic, spută purulentă sau modificări ale aspectului acesteia, hemocultură pozitivă, izolare de microorganisme patogene din aspirat traheal, spălătură bronşică sau produsele bioptice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceeaşi suspiciune o ridică şi modificarea aspectului radiologic, cu asocierea oricăruia din criteriile mai sus enumerate.

Criterii specifice sunt necesare pentru diagnosticul pneumoniei nosocomiale la copiii sub un an: prezenţa a cel puţin două semne clinice: apnee, tahipnee, bradicardie, wheezing, roncusuri, tuse şi acocierea unor probe de laborator care să indice direct sau indirect existenţa unei infecţii sau suprainfecţii microbiene.

Infecţia sanguină primară include: infecţia sanguină primară confirmată prin laborator şi septicemia clinică.

Diagnosticul de infecţie sanguină primară confirmată prin laborator este susţinut prin izolarea unui microorganism din hemocultură şi care nu este în relaţie cu o infecţie. Sunt incluse în această entitate şi infecţiile sanguine asociate cu o infecţie locală la nivelul cateterizării intravasculare. Criteriile asociate sunt în relaţie directă cu izolarea unor agenţi microbieni în hemoculturi sau cu evidenţierea prezenţei acestora în organism prin teste serologice de identificare a antigenelor bacteriene, fungice sau virale.

Septicemia clinică nosocomială poate fi diagnosticată dacă cel puţin unul din următoarele semne clinice este prezent: febră peste 38°C, hipotensiune arterială cu valori sub 90 mm Hg, oligurie cu mai puţin de 20 ml/oră; la acestea se hemocultură negativă sau neefectuată, absenţa semnelor de infecţie localizată etc.

Bacteriemia sau septicemia primară nosocomială este descrisă de autorii francezi şi belgieni ca fiind condiţionată de existenţa unei hemoculturi pozitive pentru o bacterie patogenă în absenţa altor factori şi după ce a fost eliminată o infecţie de cateter. Ea mai poate fi definită şi prin existenţa a cel puţin unei hemoculturi pozitive sau a cel puţin 2 hemoculturi pozitive diferite pentru stafilococ coagulazonegativ, Bacillus sp., Propionibacterium sp., Micobacterium sp., pentru bacili gram negativi anaerobi şi oxidativi (Aeromonas) sau Pseudomonas alţii decât P. aeruginosa. Aceasta defineţie nu include şi sindromul septic cu hemoculturi negative.

Infecţia de cateter, descrisă de autori francezi, belgieni, elveţieni prezintă mai multe aspecte :

Contaminarea cateterului se descrie atunci când există culturi pozitive ale extremităţilor acetuia, fără semnificaţie numerică (în culturi cantitative sau semicantitative), absenţa semnelor locale sau generale de infecţie.

Colonizarea cateterului: prezenţa unei culturi pozitive recoltată de la extremitatea acestuia prin tehnica cantitativă (mai mult de 1.000 UFC prin tehnica cantitativă şi mai mult de 15 UFC prin tehnica semicantitativă). Local poate exista eritem dar fără supuraţie. Colonizarea poate avea ca punct de plecare un focar la distanţă, situaţie în care microorganismul izolat în focarul septic trebuie şă fie identic cu cel identificat pe cateter.

Infecţia clinică " sub cateter" se diagnostichează dacă apar semne clinice de infecţie în legătură directă cu cateterul care este contaminat microbian la extremitate (culturi pozitive).

Bacteriemia "sub cateter" se caracterizează prin culturi pozitive ale extremităţii cateterului la care se asociază bacteriemie secundară datorată aceluiaşi microorganism izolat la cateter şi în absenâa unor focare de infecţioase cu acelaşi germen.

Criterii de diagnostic sunt detalite pentru toate cele 48 de localizări amintite mai sus dar considerăm că au fost expuse mai sus doar cele care fie subliniază aspecte particulare care nu sunt superpozabile tuturor localizarilor sau au fost explicate acele definiţii care prezintă particularităţi.

PROCESUL EPIDEMIOLOGIC ÎN INFECŢIILE NOSOCOMIALE

Sursa de infecţie

Sursă de infecţie poate fi orice persoană purtătoare de germeni (bolnavi, personal medico-sanitar, personal de îngrijire etc.) care într-un mod sau altul diseminează germenii în mediu contaminându-l.

BOSPHORUS UNIVERSITY LIBRARY

Pacientul se poate infecta din surse endogene, mai ales pacienții din serviciile chirurgicale. Este important de cunoscut procedurile aplicate pacienților pentru a identifica sursa de contaminareşi infectare şi modul de transmitere a infecției. De exemplu, la pacienții chirurgicali se consideră că cele mai multe contaminări au loc în timpul intervenției chirurugicale. Datele clinice şi experimentale sugerează că după 48 de ore de la intervenție plaga chirurgicală este suficient de cicatrizată pentru a rezista infecților de origine exogenă, mai puțin cele care au montat tub de dren sau care au fost lăsate deschise intenționat. In IN ale plăgii chirurgicale 90% sunt de origine endogenă. Dintre acestea se consideră că aproximativ 95% sunt cauzate de germeni aflați la locul de incizie, restul de 5% fiind datorate unor germeni aflați la distanță de plaga chirurgicală.

Sursa umană este purtătoare de germeni şi în acelaşi timp diseminatoare de agenți patogeni infecțioşi. Din punct de vedere clinic se poate afla în următoarele ipostaze: în faza de de boală infecțioasă clinică acută; în perioada de incubație; în starea de a fi colonizați de anumiți germeni fără a prezenta semnele sau simptomele vreunei boli aparente; purtători cronici de germeni.

O sursă importantă este flora endogenă a pacienților, care poate fi greu controlată şi care poate disemina în organism în urma manevrelor chirurgicale, a manevrelor invazive în scop diagnostic şi terapeutic etc.

Calea şi modul de transmitere

Se descriu cinci căi principale de transmitere: prin contact , prin picături de salivă, pe cale aeriană, prin obiecte şi transmiterea vectorială.

1. Transmiterea prin contact: este considerată a fi cea mai importantă şi mai frecventă modalitate de transmitere a IN. Transmiterea se poate face prin contact direct şi prin contact indirect.

Transmiterea prin contact direct presupune contactul între suprafața unui organism cu suprafața altuia şi realizarea unui transfer fizic de la persoana colonizată sau infectată "sursa" la persoana susceptibilă "receptorul".

Transmiterea prin contact indirect se realizează atunci când receptorul intră în contact cu un obiect contaminat, cum ar fi instrumentarul medical, lenjeria etc. Această modalitate include şi transmiterea prin intermediul mâinilor murdare şi a mănuşilor.

2. Transmiterea prin picături de salivă: teoretic este o formă de transmitere prin contact dar, datorită particularităților mecanismului de transfer a agentului infecțios este descrisă separat. Picăturile de salivă sunt generate şi eliberate de sursă în timpul tusei, strănutului sau chiar al vorbirii. Ele sunt eliberate în mediu şi în timpul unor manevre medicale cum ar fi bronhoscopia sau aspirația traheo-bronşică. Atunci când picăturile conțin şi microorganisme se întrunesc condițiile de transmitere a IN.

Picăturile de salivă datorită greutății lor nu rămân multă vreme suspendate în aer. Din acest motiv transmiterea are importanță relativ redusă dacă persoanele nu sunt în contact apropiat. În acelaşi timp trebuie subliniată contribuția aparatelor de aer condiționat şi a aparatelor de ventilație activă la transmiterea infecțiilor nosocomiale pe această cale.

3. Transmiterea aeriană: această modalitate intervine atât prin dispersia "nucleilor-picătură" (reziduali din picăturile de salivă, cu dimensiuni mai mici de 5μm) şi a particulelor de praf care conțin germeni şi care rămân suspendate în aer mult timp. Pe această cale microorganismele sunt transportate la mare distanță şi pot fi inhalate de persoanele susceptibile la infecție. Spre deosebire transmiterea prin picături, în acest caz ventilația activă a încăperilor are un rol benefic, reducând transmiterea pe această cale. Trebuie subliniat că transmiterea aeriană este modalitatea de transmitere a infecțiilor cu *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Transmiterea prin apă, alimente, veselă, obiecte de toaletă este mai puțin întâlnită în spitale, exceptând apariția unor deficiențe în sanitația spitalului, a circuitului alimentelor, a deşeurilor şi a reziduurilor etc.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Transmiterea prin vectori este de asemenea descrisă in mecanismele transmiterii IN dar ponderea ei în serviciile moderne este practic nulă, în condițiile implementării măsurilor antivectoriale.

Manevre medicale favorizante ale infecției nosocomiale:

- perfuziile intravenoase pot genera flebite şi septicemii cu stafilococi aurii şi epidermidis; este în creştere frecvența cu care apar infecții nosocomiale cu piocianic, klebsiele, Enterobacter spp., Acinetobacter spp. etc.
- cateterele intravenoase se contaminează frecvent, iar riscul apariție de bacteriemii creşte exponențial cu durata păstrării cateterului; în urma cateterismelor prelungite apar flebite care complică serios evoluția bolnavilor mai ales la cei imobilizați la pat;
- cateterismele vezicii urinare sunt cea mai frecventă cauză de infecții nosocomiale ale tractului urinar;
- explorările diagnostice invazive cresc riscul de apariție a infecțiilor nosocomiale, mai ales la pacienții insuficient investigați pentru patologia infecțioasă sau pentru portajul de germeni;
- intervenția chirurgicală;
- anestezia şi echipamentele de anestezie.

6. Transmiterea prin intermediul mâinii. O atenție deosebită trebuie acordată transmiterii prin intermediul mâinii. Numeroase studii subliniază contaminarea microbiană a mâinii şi efectele nefaste ale nerespectării regulilor de igienă.

Receptivitatea la infecții nosocomiale

Mediul de spital este extrem de propice pentru apariția şi propagarea infecțiilor nosocomiale, în primul rând datorită modificării apărării antiinfecțioase a pacienților.

Existența unor boli cronice cum ar fi hepatitele cronice sau cirozele, bolile pulmonare cronice, diabetul zaharat, sindroame endocrine sau administrarea de medicație imunosupresoare cum se întâmplă la bolanvii neoplazici, la pacienții care au suferit transplante, sunt condiții favorizante pentru apariția infecției nosocomiale, chiar şi în situații când se iau toate măsurile de prevenire a acestei complicații.

PRINCIPALII AGENȚI INFECȚIOŞI (CONTAMINANȚI) ÎNTÂLNIȚI IN INFECȚIILE NOSOCOMIALE

Structura etiologică a infecțiilor nosocomiale a lărgit mult sfera de cuprindere a microbiologiei medicale.

Ierarhizarea microorganismelor pe baza frecvenței cu care se constituie ca agenți etiologici ai IN este dificilă. Aici trebuie ținut cont de preocuparea pentru controlul IN, de posibilitățile tehnice de identificare, de profilul unităților sau serviciilor medicale luate în studiu etc.

Bacteriile

Dintre bacterii, în etiologia infecțiilor nosocomiale cel mai frecvent întâlnite sunt: stafilococii, enterobacteriile şi piocianicul.

Genul Staphylococcus

Staphylococcus aureus este de departe cel mai frecvent agent infecțios întâlnit în etiologia IN. Prezența stafilococilor în spitale este o problemă deosebită datorită gravității patologiei indusă de aceştia, datorită rezistenței la antibiotice a acestora.

Identificarea surselor de infecție, inclusiv a purtătorilor sănătoşi, caracterizarea tulpinilor izolate, eliminarea stafilococilor din mediul spitalicesc presupun angajarea unor resurse umane şi materiale substanțiale.

Sursa de infecție este foarte variată. Capacitatea de a coloniza mucoasele crează premisele portajului de către persoane sănătoase şi cu importanță deosebită personalul medico-sanitar. Fenomenul capătă conotații deosebite in serviciile chirurgicale. Frecvența purtătorilor nazali de stafilococ coagulazopozitiv in masa populației variază între 30 şi 50%.

În mediul spitalicesc incidența lor este şi mai ridicată, ajungând până la 80% la personalul de spital şi la bolnavii cu mai mult de două săptămâni de spitalizare. Studii personale au relevat un portaj de 18% de stafilococ patogen la personalul medical din blocurile chirurgicale

ROMANIAN UNIVERSITY LIBRARY

ale unei unități spitalicești mari din București, în condițiile supravegherii permanente și a profilaxiei portajului nazal de stafilococ la acest personal.

In grupele risc crescut pentru diseminarea agentului patogen trebuie incluși bolnavii cu infecții stafilococice cutanate, plăgi infectate sau suprainfectate, supurațiile bronhopulmonare, otite. Nazofaringele, pielea, intestinul, perineul, regiunea ombilicală și axilară la nou-născuți sunt principalele rezervoare de stafilococ patogen.

In spitale, diseminarea Staphylococcus aureus are loc prin mecanisme complexe de transmitere, posibiliățile de "infecție încrucișată " fiind foarte mari. De la purtători, stafilococul este vehiculat fie prin contact, fie pe cale aeriană. Transmiterea prin contact este favorizată de igiena defectuoasă a mâinii. Transmiterea pe cale aerogenă, prin picături și praf, este considerată principala modalitate de contaminare a bolnavilor și personalului medico-sanitar, care prin colonizarea mucoasei nazale devin purtători și implicit surse de infecție pentru cei din jur.

La aceste mecanisme se adaugă și selecția unor tulpini rezistente și multirezistente la antibiotice sub presiunea terapiei antimicrobiene. Aceste tulpini "de casă"(285) sunt extrem de greu de eliminat din spital iar patologia indusă de ele este gravă datorită slabului răspuns la terapia antimicrobiană aplicată.

Stafilococii coagulazo-negativi, cu reprezentantul cel mai important pentru patologia intraspitalicească, *Staphylococcus epidermidis*, provoacă, prin potențialul lor patogen, infecții nosocomiale în variate servicii clinice: neonatologie, chirurgie cardiovasulară, traumatologie, oncologie, infecții ce apar în urma numeroaselor manevre efectuate pacienților internați. Staphylococcus epidermidis a devenit unul dintre cei mai frecvenți agenți ai infecțiilor de cateter. Prevalența lor în spitale indică și rolul mâinilor murdare în transmiterea infecției. În același timp contaminarea predominantă cu *S. epidermidis* a diverselor materiale folosite în serviciile clinice rămâne un important factor generator al acestui tip de infecții nosocomiale. Astfel, incidențe ridicate au fost raportate în serviciile pediatrice de terapie intensivă, unde infecțiile nosocomiale cu stafilococ coagulazonegativ reprezintă 38% din totalul infecțiilor nosocomiale.

Episoadele de infecții stafilococice în spital se pot clasifica în trei categorii: a) sursa de infecție este reprezentată numai de unul sau cel mult doi dintre membrii personalului, purtători de tulpini epidemice; b) tulpinile aparținând tipului epidemic sunt mult mai răspândite printre purtători, ele putând fi întâlnite și în mediul extern; c) apariția episodului epidemic nu poate fi pusă în legătură cu un singur tip epidemic, semnalându-se multiple tipuri și implicit numeroase surse de infecție.

Familia Enterobacteriaceae

Enterobacteriile ocupă un loc important în geneza infecțiilor nosocomiale. Caracteristicile lor microbiologice, habitatul specific, prezența lor aproape constantă in ecosistemul uman, fac din enterobacterii un adversar redutabil și din păcate extrem de greu de eliminat.

Unele enterobacterii cum este Escherichia coli sunt indicatori de poluare fecală a mediului.

Incidența infecțiilor nosocomiale cu enterobacterii este variabilă, mai ales în funcție de specificul serviciului medical și de vârsta pacienților. Unele enterobacterii pot produce infecții cu caracter nosocomial, cu frecvență crescută în serviciile pediatrice și de neonatologie, mergând până la 68% din totalul IN. Infecțiile cu enterobacterii își găsesc expresia clincă cea mai severă la nou născut și la sugar.

Infecțiile cu Escherichia coli se întâlnesc cu precădere la prematuri care datorită deficitului natural de IgA și IgM manifestă o receptivitate excesivă. Incapacitatea acestor organisme de a reacționa la infecție agravează prognosticul infecției. Nou-născuții pot fi contaminați în spital cu E. coli încă din timpul delivrenței prin ingerarea microorganismelor aflate în căile genitale materne; contaminarea poate interveni în maternitate prin contactul cu mâinile personalului de îngrijire și ale mamei, cu alți copii contaminați sau bolanavi de diaree. Originea infecției poate fi extraspitalicească, mama find cea mai frecventă sursă.

Infecții nosocomiale cu *Escherichia coli* sunt înregistrate și în alte servicii medicale, cu preponderență în serviciile de urologie și ginecologie, în servicii unde sondarea urinară este o manevră medicală frecventă.

Infecțiile nosocomiale cu tulpini patogene cu alt sediu decât tubul digestiv sunt din ce în ce mai frecvent semnalate, pe primul loc fiind infecțiile tractului urinar, mai ales după sondaje vezicale urinare, dar se descriu și bacteriemii postcateter cu aspecte grave. Garau și col. comunică o dinamică ascendentă a infecțiilor nosocomiale postcateterism vezical, de la 9% în anul 1992 la 17% în anul 1996, din totalul acestor manevre medicale.

Cateterizările vezicale au o rată de infecții secundare ce se ridică la valori de până la 80%. Dintre acestea peste 50% sunt cu E. coli. Bacteria, singură sau în asociere cu alte specii bacteriene, poate determina și infectarea plăgilor chirurgicale și numeroase alte infecții prin nerespectarea regulilor de asepsie și antisepsie în timpul manevrelor medicale .

Colibacilul este implicat și în infecții de decubit ale pielii, la bolnavii imobilizați mult timp la pat, precum și în infecții biliare, post manevre chirurgicale exploratorii ale canalului coledoc.

Dintre enterobacterii sunt întâlnite ca agenți etiologici ai IN și germeni din genurile Proteus, Klebsiella și Salmonella.

Spectrul clinic este destul de divers, cuprinzând infecții enterice (germeni din genul Proteus, salmonele), infectii urinare (germeni din genul Proteus), patologie pulmonară în care este implicat din ce în ce mai mult Klebsiella pneumoniae. Acest agent etiologic este implicat și în etiologia unor septicemii și enterite nosocomiale, mai ales în secțiile de pediatrie.

O serioasă problemă o ridică infecțiile cu salmonele. Focarele nosocomiale se manifestă mai ales în secțiile de pediatrie, știind faptul că doza infectantă la sugar și copiii mici este mult mai mică decât cea a adulților, datorată mecanismelor locale de apărare. Asemenea infecții, cu evoluție sporadică sau endemo-epidemică, se întâlnesc cu precădere în servicii de nou-născuți, secții de pediatrie, leagăne de copii, creșe, dar și în unități de asistență a vârstnicilor, în servicii de boli psihice. Infecția nosocomială salmonelozică recunoaște ca factori favorizanți aglomerația din unitățile spitalicești, alimentația artificială a sugarilor, nivelul redus de sanitație. Izvoarele de infecție sunt reprezentate de bolnavi și purtători. Aceștia sunt copiii bolnavi cu infecții subclinice, excretori convalescenți sau necunoscuți de salmonele.

Rezistența remarcabilă pe care salmonelele au dezvoltat-o la terapia antimicrbiană favorizează extinderea focarelor și agravează formele clinice.

Profilul epidemiologic al infecțiilor nosocomiale cu enterobacterii este dominat de mecanismul de transmitere fecal - oral, în care o contribuție esențială o are diseminarea agenților prin intermediul mâinilor murdare; nu este exclusă nici transmiterea prin contact direct și indirect mai ales prin obiecte din vecinătatea bolnavilor, lenjerie, veselă contaminată etc.

Genul Pseudomonas

Specia Pseudomonas aeruginosa reprezintă una dintre cele mai agresive bacterii generatoare de infecții nosocomiale. Rezistența în mediu, calitatea de a coloniza mucoasele și de a genera portaj, capacitatea de a supraviețui în medii considerate ostile, cum ar fi soluțiile de clorhexidină și de clorură de benzalkoniu, dezvoltarea unei remarcabile multirezistențe la antibiotice dintre cele mai "sofisticate" toate acestea îl recomandă ca fiind cel mai redutabil germen oportunist întâlnit în patologia nosocomială și nu numai.

Piocianicul a fost izolat în apa de canal, în sifoanele de pardoseală și ale chiuvetelor; piocianicul a fost izolat și în săpunul lichid, în urinare, în praful de pe salteaua pacienților etc.

Infecțiile cu *P. aeruginosa* sunt mai des întâlnite in secțiile de chirurgie, traumatologie și arși, în serviciile de pediatrie. De regulă forma de manifestare epidemică este sporadică dar, sau descris și izbucniri epidemice. Portajul de Pseudomonas poate fi nazofaringian, frecal sau urinar. Au fost depistați purtători printre bolnavii cu spitalizări prelungite dar și în rândul personalului medico-sanitar din serviciile unde se izolează germenul.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In afară de germenii expuşi mai sus, pot fi enumeraţi mulţi alţi agenţi patogeni ai infecţiilor nosocomiale. Amintim aici doar unii agenţi identificaţi mai recent ca generatori de infecţii nosocomiale, cum ar fi Serratia marcescens, Bacteroides fragilis, germeni din genurile şi speciile Campilobacter, Yersinia enterocolitica, Legionella pneumophila, Acinetobacter, Streptococcus pneumoniae etc.

Virusurile

Virusurile ocupă un loc deosebit în patologia umană şi implicit în patologia nosocomială datorită largii lor răspândiri, multitudinii de forme clinice pe care le provoacă, variatelor modalităţi de transmitere a infecţiilor. Dificultăţile in diagnosticarea şi tratarea bolilor virale, mai ales de natură economică conduc la o supraveghere dificilă şi costisitoare a acestor infecţii.

Riscul contaminării cu virusuri şi a apariţiei unor boli determinate de acestea este greu de apreciat. Gravitatea infecţiilor nosocomiale virale este de asemenea diferită. Amintim doar gravitatea infecţiei cu virusul imunodeficienţie umane, a infecţiei cu virusurile hepatice B şi C, care presupun costuri medicale deosebite, cu impact direct şi brutal asupra individului.

Transmiterea nosocomială a acestor virusuri este tributul unor practici inadecvate, al controlului impropriu al sângelui şi derivatelor de sânge, al nesterilizării instrumentarului, al dezinfecţiei deficitare a echipamentelor etc.

Căile de transmitere sunt aceleaşi ca şi pentru ceilalţi agenţi etiologici.

Dintre virusurile cu transmitere parenterală, virusul hepatitei B se remarcă prin deosebitul potenţial infectant pe care îl are, comparativ cu alte virusuri. Doza minimă infectantă este extrem de mică. Experimental 1 ml din diluţia 1/10.000 din plasmă conţinând AgHBs a indus boala clinic manifestă, Molnar identifică 43% din hepatitele acute virale cu virus B diagnosticate în judeţele transilvănene între anii 1994–1999 ca fiind de origine nosocomială. Dintre acestea 55% au fost transmise pe cale parenterală percutană prin injecţii, 27% după tratamente stomatologice, iar 9% au fost posttransfuzionale. 6% din hepatite au avut drept cauză intervenţia chirurgicală şi 0,4% au avut caracter profesional, prin înţeparea accidentală cu ace sau instrumentar contaminat. Date asemănătoare comunică şi Drăgoi.

Virusul hepatitei C, descoperit în anul 1989, încadrat în familia Flaviviridae este implicat în cele mai multe hepatite virale posttransfuzionale ale anilor '90. Infecţiile cu acest virus se remarcă prin potenţialul ridicat de cronicizare, cu evoluţia către cancer hepatic primitiv, ciroză hepatică şi hepatită cronică.

Worman estimează că în SUA există 4 milioane de indivizi purtători de virus hepatic C şi consideră că infectarea s-a produs posttransfuzional sau după administrarea de derivate de sânge în peste 80% din cazuri. Portajul în rîndul grupurilor de drogaţi şi /sau homosexuali este ridicat, între 10-25%, ceea ce confirmă transmiterea atât parenterală cât şi sexuală a infecţiei cu virusul hepatic C.

Un alt virus cu transmitere parenterală este virusul hepatitei D, virus defectiv pentru virusul hepatitei B şi care urmăreşte îndeaproape profilul epidemiologic al virusului B. Un alt virus hepatic cu transmitere parenterală este virusul G, încadrat în familia Flaviviridae, şi care se transmite prin transfuzii de sânge.

Virusul imunodficienţei umane (HIV), descoperit în anul 1984 se constituie în cel mai redutabil adversar al speciei umane descoperit în ultimii ani. Amploarea fenomenului epidemiologic, cu implicaţii socio-economice şi psihosociale nemaiîntâlnite face din infecţia cu acest virus cea mai acută şi serioasă problemă de sănătate publică cu care se confruntă atât ţările dezvoltate economic cât şi cele în curs de dezvoltare.

Datele furnizate de literatură indică o prevalenţă foarte mică, sub 0,1%, a infecţiilor nosocomiale cu HIV. Trebuie să amintim aici că la început, până să fie identificat virusul şi modul de transmitere, hemofilici au reprezentat o pondere destul de ridicată, între 1-6% din infectaţi. În anul 1996 se raportează 0,6% din cazurile de infecţie HIV ca aparţinând hemofilicilor. Aspectul epidemiologic al infecţiei HIV şi al SIDA în România a suscitat

numeroase comentarii, iar aspectul nosocomial al caracterului infecției nu a fost exclus. Au existat si unele exagerari, se pare legate de anumite interese comerciale.

Cele mai frecvente infecții nosocomiale sunt transmise pe cale respiratorie. Dintre virusurile cel mai frecvent implicate amintim: virusurile gripale şi paragripale, rubeolic, rujeolic, virusul sincițial respirator, adenovirusurile, rhinovirusurile etc.

Prin contact direct se transmit virusurile herpetice, citomegalovirusul, virusul Epstein-Barr, care sunt implicate mai ales în infecțiile la pacienții imunocompromişi.

O altă cale de transmitere este calea fecal–orală, care se realizează atunci când sunt prezente condiții improprii de salubritate. Cităm aici virusul hepatitei A, rotavirusurile, Norwalk, care stau la baza unor focare epidemice nosocomiale mai ales în serviciile de pediatrie.

Fungii şi protozoarele

Anumiți fungi şi paraziți nu trebuie omişi din etiologia infecțiilor nosocomiale.

Implicarea lor în infecții nosocomiale se face simțită mai ales la pacienții cu imunitatea compromisă, la pacienții cu diverse transplante, la neoplazici.

Speciile de Aspergillus şi Candida sunt cel mai frecvent implicate în infecții nosocomiale. Sporii acestora persistă mult timp în mediul spitalicesc şi constituie pericole reale de contaminare a mediului şi mai ale al aerului din saloane. Intr-un studii proprii am identificat un grad ridicat de contaminare fungică, mai ales cu Aspergillus spp. şi Fusarium spp. a alimentelor păstrate în condiții improprii în oficiile şi depozitele spitalelor, rezultate care concordă cu date din literatură.

Dintre protozoare cel mai frecvent este întâlnit *Pneumocistis carinii*, la pacienții imunodeprimați, la copii cu imunodeficiențe congenitale.

Supravegherea şi controlul infecțiilor nosocomiale

Supravegherea și controlul infecțiilor nosocomiale constituie o activitate complexă, multidisciplinară, care angajează toate sectoarele de activitate ce alcătuiesc o unitate sanitară. Este unanimă părerea că infecțiile nosocomiale sunt în responsabilitatea medicului clinician, implicat direct în tratamentul pacientului iar derogarea acestei responsabilități către alte persoane este o greșeală. Clinicianul este cea mai în măsură persoană să identifice infecțiile nosocomiale şi cauzele lor în sectorul unde işi desfăşoară activitatea. Din aceste motive cele mai multe reglementări, ghiduri, norme elaborate în lume prevăd în mod expres atribuțiunile medicului clinician în supravegherea, prevenirea şi controlul infecțiilor nososcomiale. Aceste responsabilități sunt detaliate şi în Ordinul Ministerului Sănătății nr. 984/1994. În activitatea sa, clinicianul trebuie să fie sprijinit de epidemiologi, de medicii de laborator şi nu în ultimul rând de administrația spitalului. Supravegherea, controlul şi prevenirea infecțiilor nosocomiale presupun măsuri organizatorice particularizate la condițiile specifice fiecărei unități sanitare.

Supravegherea, controlul şi prevenirea infecțiilor nosocomiale vizează următoarele ținte: protecția pacientului, protecția personalului sanitar, a vizitatorilor şi nu în ultimul rând, prin atingerea primelor doua scopuri, obținerea unui raport cost-beneficiu acceptabil.

Protecția pacientului presupune reducerea cât se poate de mult a infecțiilor nosocomiale dobândite, creșterea ratei de supraviețiure, reducerea timpului de spitalizare şi bineînțeles cât mai rapida vindecare şi reintegrare socio-profesională a individului.

Sursa de infecție poate fi controlată prin depistarea tuturor purtătorilor de germeni patogeni sau potențial patogeni, cu o atenție deosebită asupra purtătorilor nazali de germeni, a celor care prezintă leziuni cutanate suprainfectate; aceeași atenție trebuie acordată contacților de boli infecțioase, vizitatorilor şi însoțitorilor bolnavilor etc.

Măsurile la nivelul căilor şi mecanismelor de transmitere sunt esențiale pentru limitarea procesului epidemiologic. Acestea presupun complexa activitate de dezinfecție, sterilizare, salubrizare, a controlului circulației germenilor şi a identificării cailor mai frecvente de transmitere a lor. Fiecare din activitățile enumerate contribuie în mod esențial la reducerea numărului de germeni circulanți, la distrugerea germenilor prezenți, la intreruperea

fenomenului de transmitere prin obiecte şi lenjerie, instrumentar, prin aerul din blocurile operatorii şi saloane, prin intermediul toaletelor etc.

În anul 1983 Centers for Diseses Control a editat "Ghidul Precauţiilor Universale" care reiterează importanţa blocării căilor şi mecanismelor de transmitere.

Generat de epidemia de hepatita posttarnsfuzională cu virusul HB şi apoi adnotat în urma debutului epidemiei cu HIV, ghidul consideră că cea mai sigură atitudine este de a considera pe oricine ca fiind infectat şi potenţială sursă de infecţie.

Un obiectiv important este protecţia personalului medical, a celorlalte persoane care vin în contact cu bolnavii. Este cunoscut şi acceptat faptul că personalul medical este supus permanent agresiunii germenilor care sunt purtaţi sau transportaţi de pacienţi.

Aplicând politica precauţiei complete prin respectarea măsurilor de igienă personală, utilizarea echipamentelor de protecţie, prin stabilirea unor circuite sigure tuturor materialelor şi produselor contaminate microbian, se reduce substanţial riscul de apariţie a infecţiilor nosocomiale.

La nivelul masei receptive trebuie luate măsuri profilactice eficiente. Pot fi enumarate aici măsuri de izolare a pacienţilor cu risc înalt de infecţii nosocomiale cum sunt politraumatizaţii, arşii, pacienţii care au suportat grefe, transplanturi de organe, imunocompromişii etc. Reducerea duratei de spitalizare, evitarea efectuării unor manevre diagnostice şi terapeutice cu risc crescut pentru infecţiile nosocomiale constituie alte măsuri menite să reducă incidenţa şi prevalenţa infecţiilor intraspitaliceşti.

Profilaxia infecţiilor nosocomiale prin administrarea pre-, intra- şi postoperatorie a antibioticelor este cea mai controversată măsură şi în acelaşi timp, din păcate, cel mai frecvent utilizată, ceea ce duce la consumul excesiv şi nu de puţine ori inutil al acestor substanţe medicamentoase. Riscurile apariţiei de tulpini rezistente şi multirezistente la antibiotice, inutilitatea administrării de antibiotice în anumite situaţii sau infecţii sunt probleme cu care se confruntă medicina contemporană.

Un aspect de multe ori ignorat de lumea medicală dar care se repercută asupra calităţii actului medical este acela al costurilor serviciilor de sănătate.

In condiţiile unei economii de piaţă, a bugetării reduse din resurse publice, modul în care unitatea medicala îşi administrează şi cheltuieşte fondurile de care dispune, influenţează direct şi brutal însăşi existenţa instituţiei. Programele de prevenire a IN aduc beneficii importante din acest punct de vedere. Menţinerea stării de sănătate a personalului sanitar, evitarea absenteismului provocat de IN, conduc la reducerea costurilor. Un aspect nu întotdeauna uşor de analizat şi mai ales de implementat este acela al costurilor pe care le presupune aplicarea tuturor măsurilor profilactice indreptate împotriva apariţiei si dezvoltării IN într-o unitate spitalicească. Este evident că, cel puţin pentru început, fodurile alocate pentru IN cresc substanţial costurile asistenţei medicale curente. In timp, reducerea ratei IN atrage după sine şi reducerea acestor costuri care vor fi degrevate de cheltuielile suplimentare necesare tratării IN. Oricum, implementarea fiecărei măsuri profilactice trebuie să fie argumentată prin raportul cost-beneficiu. Aici trebuie luate în calcul costurile directe şi indirecte ala combaterii unor IN manifeste, raportate la costurile presupuse de implementarea măsurilor profilactice. Creşterea inutilă a costurilor îngrijirii pacienţilor duce la compromiterea politicilor de reducere a IN.

Din cele mai sus prezentate putem concluziona că indiferent de etiologia unei infecţii nosocomiale, de modul de manifestare a acesteia, măsurile profilactice sunt cele mai eficiente şi mai economice, reducând drastic costurile materiale si sociale ale fenomenului iar măsura principală trebuie să aibă drept scop final reducerea florei microbiene care circulă în spital.

SISTEME COMPUTERIZATE PENTRU SUPRAVEGHEREA INFECŢIILOR NOSOCOMIALE ŞI A REZISTENŢEI MICROBIENE LA ANTIBIOTICE

Dezvoltarea de neimaginat în urmă cu o jumatate de secol a ciberneticii şi informaticii, a componentei hard dar şi a programelor ce constituie componenta soft a unui computer,apariţia computerelor personale, a sistemelor de comunicaţii prin satelit şi a transmiterii de date prin

fibre optice şi prin unde de înaltă şi ultraînaltă frecvenţă au dus la schimbarea fundamentală a modului de viaţă şi de muncă în cele mai diverse domenii de activitate.

Este de neconceput ca în prezent un echipament medical modern să nu fie înzestrat cu un computer personal care înmagazinează datele, le prelucrează, le editează şi le tipăreşte, ducând astfel la creşterea eficienţie activităţii, a preciziei şi la scurtarea duratei de lucru.

Acest domeniu care a depăşit cu mult cele mai optimiste aşteptări de acum 40 de ani se transformă într-un nou mod de viaţă.

Apariţia reţelei INTERNET sau World-Wide-Web şi deschiderea ei pentru publicul larg a adus cu sine posibilitatea schimbului de informaţii, cu transmiterea unui volum imens de date la distanţe considerabile în timp real. La începutul anilor '70 de Departamantul American al Apărării a iniţiat un proiect de cercetare numit ARPAnet cu scopul realizării unei reţele de computere destinată coordonării acţiunilor militare. Reţeaua a fost astfel proiectată încât distrugerea unei părţi a ei să nu afecteze şi funcţionarea restului rămas intact. Această "filosofie" a rămas valabilă şi astăzi pentru proiectarea Internetului. Datele sunt transmise în pachete, folosind tehnici de comunicaţie standard (Protocoale Internet TCP/IP). Atât timp cât pachetele sunt corect adresate ele pot fi transmise de la oricare computer de pe Internet către oricare alt computer aflat în reţea pe orice rută disponibilă. Marele avantaj constă în posibilitatea transmiterii aceleiaşi informaţii pe orice altă rută găsită disponibilă dacă prima cale "cade" sau este blocată.

În anii '80 reţeaua a devenit disponibilă instituţiilor academice şi guvernamentale. După anul 1990 politica de deschidere informaţională promovată de guvernul american a permis conectarea oricărei companii şi a oricărui individ, astfel că în anul 1995 în reţaua Internet erau conectaţi peste 35 de milioane de abonaţi din peste 135 de ţări. Putem defini "Internetul" ca o reţea internaţională de computere care este interconectată cu alte reţele locale şi regionale de computere.

Serviciile oferite sunt dintre cele mai diverse, de la informaţii curente până la realizarea de manifestări ştiinţifice "on line", la care schimbul de informaţii, susţinerea comunicărilor, discuţiile se desfăşoară într-un spaţiu virtual, dar cu participarea efectivă, reală şi directă a fiecărui participant prin computerul său.

Pe baza acestui principiu au apărut şi s-au dezvoltat "biblioteci" medicale, adevărate colecţii ale publicaţiilor medicale care pot fi accesate direct, on line, au apărut site-uri unde informaţia medicală este continuu actualizată. Amintesc aici site-ul PROMED care este patronat de Asociaţia Internaţională pentru Boli Infecţioase, http://www.isid.org/ şi care primeşte informaţii din toată lumea referitoare la evoluţia bolilor infecţioase şi care la rându-i le transmite, gratuit tuturor celor care accesează adresa http//www.promedmail.org.

Toate aceste realizări, de la nivelul unităţii de bază, computerul personal cu softurile sale până la reţelele de transmitere a datelor, la care se adaugă dezvoltarea continuă a performanţelor funcţionale ale echipamentelor au permis apariţia unor programe dedicate celor mai diverse domenii. Printre acestea se numără şi programe pentru supravegerea epidemiologică, bănci de date pentru genetică, microbiologie, farmacologie, toxicologie etc.

Asemenea sisteme au fost create la nivelul celor mai diverse organisme, de la cele guvernamentale până la nivelul laboratoarelor de spital sau particulare.

Astfel în SUA a fost creat National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS). Prin intermediul acestui program şi sistem informaţional are loc acumularea de date specifice referitoare la rezistenţa microbiană la antibiotice, apariţia şi evoluţia focarelor de infecţii nosocomiale. Datele sunt furnizate de mai mult de 250 de spitale şi institute medicale de pe teritoriul american dar, pot fi trimise date şi de alte instituţii din afara SUA care se conformează cerinţelor sistemului. Datele sunt publice şi pot fi consultate pe site-ul Centers of Diseases Control http://www.cdc.gov. Informaţiile raportate permit calcularea incidenţei infecţiilor nosocomiale şi a prevalenţei lor.

BUMS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Asemenea sisteme au fost create şi în Europa. În Franţa este activ şi contribuie la supravegherea infecţiilor nosocomiale un sistem organizat pe regiuni şi intitulat CLIN, care poate fi accesat la adresa:http://www.nice.univ-lyon1.fr. Datele înmagazinate se referă la caracteristicile spitalelor, date despre pacienţi, detalii referitoare la serviciile medicale prestate, germenii microbieni mai frecvent izolaţi şi comportamentul lor faţă de antibiotice. Acest sistem permite elaborarea unor politici locale, adecvate pe datele raportate din fiecare zonă a tării. Volumul mare de date transmise şi acumulate în banca de date a sistemului a impus realizarea unor subprograme specializate pe un anumit domeniu cum ar fi rezistenţa microbiană sau activitatea unui anumit serviciu clinic.

Un sistem asemănător, dar axat strict pe raportarea rezistenţei microbiene la antibiotice a fost realizat şi pus în aplicare în Marea Britanie, sub coordonarea Laboratorului de Referinţă pentru Monitorizarea Rezistenţei la Antibiotice (Antibiotic Resistance Monitoring & Reference Laboratory, ARMRL), care poate fi accesat la adresa http://www.phls.co.uk. La baza băncii de date se află standardizarea metodelor de izolare, identificare şi testare a sensbilitaţii la antibiotice a germenilor la nivelul unor laboratoare considerate de referinţă într-o anumită regiune. În acest fel toate datele sunt comparabile între ele şi fenomenul poate fi urmărit în dinamica sa la nivel naţional. Pentru anul 2000, de exemplu a fost aleasă ca obiectiv specific identificarea de noi betalactamaze şi supravegherea rezistenţei la antibiotice a cocilor gram-pozitivi şi a piocianicului.

Astfel de sisteme naţionale sunt organizate şi în alte ţări europene: Austria, Belgia, Danemarca, Elveţia, Finlanda, Germania, Grecia, Italia, Olanda, Spania etc.

Pe lângă sisteme naţionale există şi un sistem european, European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS, http://www.cid.harvard.edu) care acumulează informaţii din mai multe ţări europene şi care furnizează informaţii despre circulaţia şi rezistenţa microbiană. Aceste sisteme de supraveghere se bazează pe funcţionarea ireproşabilă a unor programe–soft care permit utilizatorului să realizeze o bancă de date şi să le prelucreze.

În anul 1998 a fost deschis un sistem intitulat WARN – Worlwide Antimicrobial Resistance Network, la adresa http://warn.utia.cas.cz, care îşi propune să gestioneze date raportate din diverse laboratoare şi să furnizeze utilizatorilor informaţii utile despre fenomenul rezistenţei microbiene la antibiotice.

Un site extrem de interesant şi util este ResistanceWeb, finanţat de firma Rhone Poulenc Rorer Pharmaceuticals Inc., accesabil pe Internet la adresa: http://resistanceweb.pharmacy-ce.org.

Există programe realizate la nivelul unor instituţii guvernamentale cum ar fi pachetul EPIINFO creat de CDC Atlanta sau organizaţii internaţionale repectiv Organizaţia Mondială a Sănătăţii, cu programul WHONET. Ambele softuri sunt la dispoziţia oricărui utilizator care doreşte să-şi creeze propriul program sau propria aplicaţie, ceea ce permite adaptarea la caracteristicile şi nevoile spitalului sau laboratorului propriu.

Pachetul EPIINFO are mai multe subprograme şi aplicaţii care permit crearea de baze de date, efectuarea de calcule specifice, realizarea unor teste statistice.

În Romania primul sistem informatizat de analiză epidemiologică a rezistenţei dobândite la antibiotice a fost conceput şi realizat încă din anul 1978 de către V. Rusu.

Acest sistem era conceput ca o bancă de date care putea lista principalii germeni testaţi şi caracteristicile lor.

Programe computerizate pentru supravegherea infecţiilor nosocomiale şi a fenomenului de rezistenţă microbiană la antibiotice pot fi găsite în reţaua INTERNET, cele mai multe dintre ele fiind produsul şi proprietatea unor companii specializate în informatică sau a unor firme şi ascoiaţii care au drept scop controlul infecţiilor intraspitaliceşti, producţia de antibiotice, reactivi şi medii de cultură.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Iată câteva exemple, identificate pe site-ul http://www.univ-lille2.fr/nosoweb/ liens/ logiciels.html:

ResistanceWeb, care crează o bancă de date ce poate fi accesată de cei care participă direct la dezvoltarea ei.(http://resistanceweb.org);

Bearsoft –Hospital Epidemiology made easy, creat de Societatea Bearsoft din Belgia; este alcătuit din două pachete, BacStat-S şi BacStat-L, destinate laboratoarelorde microbiologie şi având posibilitatea prelucrării datelor după variabile utilizate în supravegherea infecţiilor nosocomiale;

InPrev 1.0. – program pentru realizarea anchetei de prevalenţă a infecţiilor nosocomiale, creat de Cauet D., Quenon si Desve.

Prin această succintă prezentare a unor programe şi a unor sisteme de supraveghere a infecţiilor nosocomiale şi a rezistenţie microbiene la antibiotice am urmărit să subliniez avantajele pe care acestea le oferă specialistului:

- posibilitatea realizării unei bănci de date vastă, uşor accesibilă şi transferabilă;
- realizarea unor studii statistice ale datelor înmagazinate, cu utilizarea celor mai complexe formule de calcul, cu economie mare de timp şi cu acurateţea oferită de realizarea automată a tuturor operaţiilor matematice;
- posibilitatea editării facile şi în forme grafice adecvate a concluziilor rezultate în urma analizării datelor;
- posibilitatea realizării de intercomparări, a transferului rapid de date, afilierea la baze de date mult mai puternice sau apelarea la instrumente de calcul "on line" ceea ce scade considerabil costul tuturor operaţiunilor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 7

ANTIBIOTICELE TESTATE PENTRU EFICIENȚA ACTIVITĂȚII ANTIMIBACTERIENE

In studiul nostru statistic am identificat 53 de substanțe antimicrobiene a căror activitate antimicrobiană a fost testată constant sau sporadic în cadrul laboratorului pe parcursul deceniului 1990-1999. Dintre acestea doar 32 de antibiotice au fost testate permanent sau pentru o perioadă de timp mai îndelungată. Aceste antibiotice sunt:

- betalactamine:

peniciline:
penicilina G (PEN), ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), oxacilina (OXA)
şi asocierea amoxicilina+acid clavulanic (ACV);
carboxipeniciline: carbenicilina (CAB), ticarcilina (TIC);
ureidopeniciline: azlocilina (AZL), piperacilina (PIP);
carbapenemi: imipenem (IMI);
cefalosporine:
generația a I-a: cefalotina (CLT), cefalexina (CFL);
generația a II-a: cefoxitina (COX), cefuroxima (CFU);
generația a III-a ceftazidima (CFT), ceftriaxona (CFX);

- aminoglicozide:

streptomicina (STR), kanamicina (KAN);
gentamicina (GEN);
amikacina (AMK), netilmicina (NET);

- polimixine:

colimicina (COL)

- macrolide:

eritromicina (ERT);
claritromicina (CLR), azitromicina (ATR);

- chinolone:

acidul nalidixic (NAL);
ofloxacina (OFL), ciprofloxacina (CIP);

- tetracicline:

tetraciclina (TET);

- cotrimoxazolul (CTX);
- rifampicina (RIF);
- metronidazolul (MTR).

Abrevierile prezentate în paranteză sunt folosite în continuare în tabele şi în reprezentările grafice.

In cadrul spitalului unele dintre aceste antibiotice au fost utilizate mai frecvent la începutul decadei studiate, fiind apoi inlocuite şi părăsite, cum ar fi cazul streptomicinei, kanamicinei sau carbenicilinei. Alte antibiotice au intrat mai de curând în arsenalul terapeutic al spitalului cum ar fi netilmicina sau claritromicina şi azitromicina. Aprovozionarea cu antibiotic este şi ea mult influențată de resursele financiare de care dispune spitalul la un anumit moment.

În ancheta noastră am introdus doar acele antibiotice care au fost testate constant. De asemenea pentru a nu încărca cu date irelevante ancheta, am prezentat doar acele antibiotice care au importanță clinică.

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În tabelul nr. 3 este prezentată eficacitatea (exprimată în procente) a principalelor antibiotice testate asupra principalelor specii bacteriene izolate şi identificate în spital.

Tabelul 3. Acţiunea antibioticelor asupra principalelor specii bacteriene izolate şi identificate in spitalele militare in anul 1995 exprimată în %

ANTIBIOTIC	AGENTUL MICROBIAN						
	STAPH *	STR. PNEUM	ESCH. COLI	KLEB PN.	PROT. MIRAB	PIOC	EBACT
PENICILINA	9	63	-	-	-	-	-
OXACILINA	67	-	-	-	-	-	-
AMPICILINA	36	73	67	71	53	7	59
AUGMENTIN**	61	88	53	79	62	40	71
TICARCILINA	91	-	91	95	98	96	92
PIPERACILINA	90	-	81	85	72	92	75
CEFUROXIMA	88	-	92	93	98	26	-
CEFTRIAXONA	82	-	63	95	-	68	96
CEFTAZIDIMA	83	-	82	93	-	81	-
IMIPENEM	78	-	78	87	95	94	84
GENTAMICINA	78	-	79	76	-	59	-
AMIKACINA	79	-	78	-	-	71	-
RIFAMPICINA	63	-	19	84	93	-	86
ERITROMICINA	65	87	-	-	-	-	-
VANCOMICINA	99	-	-	-	-	-	-
CLORAMFENICOL	64	-	41	86	91	9	82
TETRACICLINA	12	-	26	11	17	-	-
CIPROFLOXACINA	85	-	79	68	-	83	89
OFLOXACINA	-	-	76	83	91	76	93
COTRIMOXAZOL	58	64	64	83	-	-	71

*LEGENDA: * STAPH –Staphylococcus aureus; STR. PNEUM – Streptococcus pneumoniae ;ESCH. COLI – Escherichia coli ; KLEB. PN – Klebsiella pneumoniae
PROT. MIRAB – Proteus mirabilis, PIOC. – Pseudomonas aeruginosa
EBACT. – Enterobacter spp.
** AUGMENTIN: denumire comercială pentru asocierea amoxicilina+acid clavulanic.

După cum se poate observa marea majoritate a antibioticlor clasice are eficacitate asupra 65-70% din tulpinile testate. Desigur această concluzie nu are nici un fel de semnificaţie practică.

Doar analiza comportamentului ţintit al antibioticelor asupra germenilor testaţi poate sta la baza unor concluzii pertinente şi folositoare în formularea unor strategii eficiente pentru reducerea utilizării neraţionale a antimicrobienelor.

Baza de date imensa realizata de noi, a fost fragmentata pe criterii clinice si microbiologice, pentru a putea fi prelucrata si pentru ca rezultatele statistice sa aibe o finalitate practica pentru terapia antimicrobiana.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SECȚII CLINICE CU RISC ÎNALT PENTRU INFECȚII NOSOCOMIALE

Ținând cont de datele prezentate anterior și de datele din literatură am considerat util să analizez secția de traumatologie și secția de reanimare și terapie intensivă (ATI) urmărind următoarele aspecte:

- prelevatele recoltate și trimise pentru examenul microbiologic;
- speciile bacteriene izolate;
- asocierile de germeni în prelevate;
- prezența aceluiași germen în mai multe prelevate recoltate de la un singur pacient;
- numărul de examane microbiologice solicitate pentru un pacient.

Rezultatele obținute prin studierea băncii de date a laboratorului de microbiologie reflectă realitatea din spitale.

Secția Traumatologie

În perioada analizată au fost trimise pentru examen bacteriologic 64 de prelevate, conform tabelului nr. 4.

Tabel nr. 4 Germenii izolați și identificați în secția Traumatologie

AGENTUL PATOGEN	PLAGA	DREN	URINA	HEM	SPUTA	TOTAL IZOLATE
Staphylococcus aureus	18	2	0	1	1	22
Staphylococcus epidermidis	12	0	0	0	0	12
Escherichia coli	4	1	8	0	0	13
Klebsiella pneumoniae	4	2	2	0	1	9
Proteus mirabilis	0	0	1	0	0	1
Enterobacter cloacae	3	0	1	0	0	4
Pseudomonas aeruginosa	1	0	2	0	0	3
TOTAL PRELEVATE	42	5	14	1	2	64

După cum se poate observa în prelevatul secreție plagă (PLAGA) stafilococul auriu reprezintă aproape 45%, iar stafilococul epidermidis 30%. Aceste date confirmă datele din literatură care atribuie stafilococilor locul I în etiologia infecțiilor nosocomiale, mai ales în serviciile chirurgicale în care nu se deschide cavitatea abdominală.

Analizând germenii izolați și identificați în funcție de prelevat observăm:

a. specia Staphylococcus aureus a fost izolat în cel puțin două prelevate la 3 pacienți.

Prelevatele sunt distribuite astfel:

- secreție plagă + secreție tub de dren = 2 pacienți;
- secreție plagă + hemocultura = 1 pacient.

Trebuie menționat că în perioada aleasă a fost recoltată o singură hemocultură, pozitivă pentru stafilococ auriu.

b. specia Staphylococcus epidermidis a fost izolat numai în prelevatul secreție plagă.

Cei doi stafilococi au fost izolați și identificați la același pacient în 3 cazuri, prelevatul in care au fost izolați fiind secreție plagă.

c. specia Klebsiella pneumoniae. A fost izolată și identificată în prelevatele secreție plagă, secreție tub de dren, urină și spută.

Aici trebuie să particularizăm un pacient la care pe parcursul a 12 zile Klebsiella pneumoniae a fost izolată și identificată în secreția plagă – 1 probă și după 36 de ore , în secreție tub de dren și în spută.

Unui alt pacient i-a fost uzolată și identificată o tulpină de Klebsiella pneumonie din două prelevate, urină și secreție tub de dren. La acest pacient a fost izolată și o tulpină de stafilococ epidermidis.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

d. specia Escherichia coli a fost izolată şi identificată în trei prelevate: secreţie plagă – 4 probe, secreţie tub de dren – 1 probă şi urină – 8 probe.

Colibacilul a fost prezent în mai multe prelevate recoltate de la acelaşi pacient doar într-un singur caz, bacteria fiind prezentă în secreţie plagă şi urină specia Pseudomonas aeruginosa a fost izolată şi identificată în prelevatele urină şi secreţie plagă, 3 probe.

Dintre aceste probe două provin de la acelaşi pacient, respectiv urină şi secreţie plagă.

Această reprezentare grafică ne furnizează informaţii utile despre prelevate, considerate ca o entitate.

Informaţia este foarte utilă atât clinicianului cât şi epidemiologului. Identificarea unui agent patogen în prelevate diverse poate indica sursa dar şi calea de transmitere a bacteriei.

De exemplu, prezenţa unei tulpini de Klebsiella pneumoniae în urină, secreţie tub de dren şi spută îndică, în absenţa altor evidenţe, circulaţia unui germen de spital. Am ales acest exemplu deoarece în secţia de terapie intensivă (ATI) există o situaţie similară, ce va fi descrisă la paragraful respectiv.

Am întâlnit această situaţie la un pacient, amintit mai sus, la care au fost izolateă şi identificate:

- 1 tulpină de *Klebsiella pneumonie* în prelevatele urină şi secreţie tub de dren;
- 1 tulpină de *Staphylococcus epidermidis* în prelevatul secreţie tub de dren.

Pentru elucidarea etiologiei infecţiei la 24 de ore de la obţinerea rezultatului s-a repetat examenul microbiologic pentru prelevatul secreţie tub de dren.

Rezultatul a fost acelaşi: prezenţa în prelevat a unei tulpini de Klebsiella pneumoniae şi a unei tulpini de staphylococcus epidermidis. Putem afirma fără nici un dubiu că la acest pacient evoluează o infecţie nosocomială.

Datele obţinute sugerează că la nivelul secţiei de traumatologie circulă germeni care pot fi consideraţi ca "germeni de spital" şi care pot provoca infecţii nosocomiale.

Absenţa identificării tulpinilor circulante prin lizotipie sau prin tipare fagică etc. ne privează de posibilitatea stabilirii circuitului tulpinilor în spital şi a identificării tulpinilor implicate în infecţiile nosocomiale dintr-o secţie sau din secţii diferite.

Un aspect particular observat este acela al prezenţei într-un prelevat a mai multor specii bacteriene.

Secţia ATI

Rezultatele obţinute prin studierea băncii de date a laboratorului de microbiologie reflectă realitatea din trimestrul al II-lea al anului 1999.

În intervalul amintit au fost izolate şi identificate 38 de tulpini bacteriene, conform tabelului 5.

Tabel 5 Germenii izolaţi şi identificaţi în secţia ATI

AGENTUL PATOGEN	PLAGA	DREN	URINA	HEM	SPUTA	LICHID PLEURAL	TOTAL IZOLATE
Staphylococcus aureus	1	1	0	0	1	1	4
Staphylococcus epidermidis	1	0	0	1	0	1	3
Escherichia coli	0	4	2	1	0	0	7
Klebsiella pneumoniae	8	3	3	1	0	1	16
Proteus mirabilis	0	0	0	0	0	0	0
Enterobacter cloacae	1	2	0	0	0	0	3

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pseudomonas aeruginosa	1	3	1	0	0	0	5
TOTAL PRELEVATE	12	13	6	3	1	3	38

Remarcăm din datele obținute ponderea foarte mare pe care o are specia Klebsiella pneumoniae între speciile microbiene izolate şi identificate, în comparație cu ponderea avută în ansamblul general, în care reprezintă doar 12%.

Distribuția după prelevat a germenilor izolați şi identificați sugerează şi posibilele tulpini microbiene de proveniență intraspitalicească. Analiza profilului fiecărei specii ne permite să susținem afirmația de mai sus. Analizând fiecare specie izolată în parte am constatat următoarele aspecte:

a. Staphylococcus aureus reprezintă 11% din totalul germenilor izolați şi identificați. El a fost izolat, cu excepția prelevatului urină în toate celelalte prelevate. Au fost izolate 4 tulpini, una dintre ele din două probe ale prelevatului lichid pleural, iar alta din din prelevatul secreție tub dren la un pacient la care s-a identificat şi specia Klebsiella pneumoniae în prelevatul secreție plagă.

b. specia Staphylococcus epidrmidis a fost izolată din prelevatele recoltate de la doi pacienți diferiți. Unul a avut prezent germenul în prelevatul hemocultură. Al doilea pacient a avut două prelevate pozitive pentru epidermidis, secreție tub de dren şi lichid pleural. Nu avem informații despre locul unde a fost montat tubul de dren, dar nu este exclusă localizarea toracică a acestuia. De asemenea acest pacient figurează doar o dată în evidențele laboratorului de microbiologie.

c. Escherichia coli reprezintă 18 % din germenii izolați, fiind prezent în prelevatele secreție tub de dren, hemocultură şi urină. Cele 7 prelevate din care s-a izolat şi identificat colibacil provin de la 6 pacienți diferiți, fiind distribuite astfel:

- tulpinile izolate în urină provin de la doi pacienți diferiți, unul dintre ei cu două uroculturi pozitive pentru colibacil;
- patru tulpini izolate în prelevatul secreție tub de dren. Dintre acestea două prelevate provin de la doi pacienți cu câte un singur examen microbiologic pozitiv, conform evidențelor laboratorului. Un al treilea pacient este înregistrat şi cu hemocultură pozitivă pentru colibacil, agentul patogen fiind prezent la acelaşi pacient în două prelevate diferite. Cel de-al şaselea pacient are pe lângă tulpina de colibacil izolată în prelevatul secreție tub de dren şi o probă pozitivă pentru Pseudomonas aeruginosa, izolată şi identificată în prelevatul secreție tub de dren.

d. specia Klebsiella pneumoniae a fost izolată şi identificată în prelevatele: secreție tub de dren, secreție plagă, hemocultură şi urină. Trebuie subliniată ponderea mare a acestui bacil în prelevatul secreție plagă, respectiv 75% din tulpinile izolate.

Din punct de vedere al distribuției după prelevat şi pacient se descriu următoarele aspecte:

- prelevatul secreție tub de dren provine de la trei pacienți diferiți. Dintre aceştia doar unul are o singură probă pozitivă pentru acest prelevat. Unui al doilea pacient i s-a izolat patogenul atât în prelevatul secreție tub de dren cât şi în prelevatul urină. Al treilea pacient a avut examenul microbiologic pozitiv pentru Klebsiella pneumoniae în prelevatele secreție tub de dren şi secreție plagă;
- prelevatul secreție plagă provine de la pacienți la care agentul patogen nu a mai fost izolat şi identificat în alt prelevat, cu două excepții: prima amintită în aliniatul precedent; cea de a doua în care a fost pozitivă urocultura pentru acelaşi germen izolat în prelevatul secreție plagă;
- trebuie subliniat că examenul microbiologic a fost repetat şi rezultatul a fost identic la doi pacienți;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Klebsiella pneumoniae a fost izolată în hemocultura unui pacient care nu mai figurează în registrul laboratorului pentru alte examene;

e. bacilul piocianic a fost izolat şi identificat de cinci ori în prelevatele: secreţie tub de dren, secreţie plagă şi urină. Distribuţia tulpinilor de piocianic este următoarea:

- trei tulpini de piocianic izolate şi identificat în prelevatul secreţie tub de dren, distribuite astfel: două tulpini de Pseudomonas aeruginosa izolate în prelevatul secreţie tub de dren, una provenind de la un pacient cu un singur examen microbiologic; cea de-a doua tulpină a fost izolată la un pacient cu rezultat pozitiv pentru acelaşi patogen în prelevatul secreţie plagă. Cea de a treia tulpină de piocianic izolată şi identificată în prelevatul secreţie tub de dren provine de al un pacient la care în acelaşi prelevat a fost izolat şi colibacil;
- tulpină de piocianic a fost izolată şi identificată în urina unui pacient.

f. au fost izolate şi identificate trei tulpini de Enterobacter cloacae, două în prelevatul secreţie tub de dren şi una în prelevatul secreţie plagă, provenind de la trei pacienţi diferiţi; nici unul dintre examene nu a fost repetat pentru confirmare sau pentru verificarea eficienţei tratamentului.

Din reprezentarea grafică putem observa că specia Klebsiella pneumoniae este prezentă în toate prelevatele recoltate şi examinate microbiologic, mai puţin sputa. Situaţia este asemănătoare cu cea descrisă la secţia de traumatologie.

Ţinând seama de datele epidemiologice analizate: repartiţia agentului patogen după prelevat, prezenţa acestuia în prelevate care sugerează prezenţa unei infecţii nosocomiale, cum sunt secreţie tub de dren sau secreţie plagă, ponderea agentului patogen între ceilalţi germeni izolaţi, putem afirma că prezenţa tulpinilor de Klebsiella pneumonie în prelevatele recoltate de la pacienţii secţiei ATI este de natură nosocomială.

Un argument important în susţinerea acestei afirmaţii este şi prezenţa aceleiaşi specii patogene în prelevatele recoltate de la pacienţii din secţia traumatologie. Din păcate absenţa tipării tulpinilor bacteriene izolate şi identificate nu ne permite să stabilim cu exactitate circulaţia în spital a tulpinilor suspectate a fi de originenosocomială.

PRINCIPALELE SPECII BACTERIENE ANALIZATE

Specia Staphylococcus aureus

Din totalul de 1.218 tulpini de stafilococ auriu izolate şi identificate 1.073 de tulpini au corespuns criteriilor de introducere în studiu. Prelevatele în care a fost izolat stafilococ auriu sunt prezentate în tabelul nr. 6.

Tabel 6 Prelevatele în care a fost izolat şi identificat Staphylococcus aureus

PRELEVAT	Nr.tulpini
secreţie plaga	287
exudat nazal	156
exudat faringian	161
secreţie conjunctivală	104
secreţie otică	84
secreţii genitale	91
secreţie tub de dren	75
puroi	70
hemocultură	11
secreţie pleurală	13
alte	21
TOTAL	1073

Remarcăm încă de la început că 40% din totalul produselor este cuprins în: secreţii plagă, puroi şi secreţii tub de dren.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Antibioticele utilizate de laborator pentru testarea eficacității lor asupra stafilococilor sunt trecute în tabelul nr. 8.

Am marcat în același timp și momentul în care ele au fost introduse în practica laboratorului în mod curent și au intrat în arsenalul terapeutic al spitalului.

Din punct de vedere al utilizării ca primă intenție terapeutică am observat următoarele aspecte:

- în anul 1993 betalactaminele – penicilinele (penicilina G, ampicilina și oxacilina) sau cefalosporinele (cefazolin sau cefuroxim) asociate sau nu cu un aminoglicozid, cel mai frecvent gentamicina, reprezintă peste 60% din prima intenție terapeutică. Asocierea ampicilină + gentamicină este cea mai utilizată în administrarea profilactică pre- și postoperatorie. Fluorochinolonele ocupă locul al doilea, cel mai des fiind administrată ciprofloxacina, apoi pefloxacina ;
- după anul 1996 ponderea penicilinelor a scăzut, acestea fiind înlocuite de cefalosporinele de generația a III-a, cel mai frecvent utilizată fiind ceftazidima, urmată de ceftriaxonă și de cefuroximă (cefalosporină de generația a II-a). Fluorochinolonele sunt tot pe locul al doilea dar la diferență foarte mică de cefalosporine; aminoglicozidele ocupă locul al treilea, gantamicina fiind în continuare cel mai des utilizată dar, amikacina și din 1998 și netilmicina, încep să fie utilizate pe scară din ce în ce mai largă. Penicilinele sunt aproape uitate.

Este de subliniat că oxacilina și gentamicina revin în actualitate atunci când antibiograma indică sensibilitatea stafilococilor la acestea.

Datele obținute privind comportamentul față de antibiotice al tulpinilor de stafilococ auriu izolate sunt trecute în tabel, datele înregistrate de noi sugrează o diminuare a rezistenței stafilococilor la aceste antibiotice.

Aceeași tendință de "pierdere a rezistenței" o înregistrăm și în cazul gentamicinei și al cotrimoxazolului, precum și în cazul oxacilinei, rifampicinei și cotrimoxazolului.

Pentru a elimina eventualele erori de interpretare a datelor prezentate, datorate, eventual, metodei diferite de lucru în graficul nr.26 este prezentată rezistența stafilococilor. Tendințele reale de evoluție a rezistenței stafilococilor la antibiotice pot fi mai bine evaluate.

Cu excepția asocierii amoxicilină+acid clavulanic care pierde evident din eficacitate, celelalte antibiotice își păstrează activitatea în limite care sunt cunoscute și care se încadrează în datele publicate în literatură.

Intr-o etapă ulterioară am investigat comportamentul față de antibiotice al stafilococilor izolați din prelevatele recoltate în ambulatorul spitalului și în serviciul de traumatologie.

Am stabilit ca lot de referință probele recoltate în ambulatorul spitalului deoarece în cea mai mare parte pacienții acestui serviciu sunt tineri, cu afecțiuni infecțioase acute și care nu au urmat tratamente cu antibiotice pe termen lung.

În ambulatorul spitalului în timp de un an au fost izolate 114 tulpini de stafilococ auriu a căror comportament față de antibiotice este detaliat în tabelul 7. În același tabel sunt înregistrate și valorile obținute în urma analizării comportamentului stafilococilor aurii izolați și identificați în prelevate provenite din serviciul de traumatologie,în aceeași perioadă.

Tabel nr. 7 Comportamentul stafilococilor aurii față de antibiotice în ambulator versus traumatologie

ANTIBIOTIC	AMBULATOR			TRAUMATOLOGIE		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
PENICILINA	114	27	87	47	1	46
AMPICILINA	114	61	53	47	11	36

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

AMOXICILINA + ACID CLAVULANIC	114	96	18	47	28	19
OXACILINA	114	96	18	47	25	22
CEFUROXIMA	114	106	8	47	40	7
CEFTAZIDIMA	114	98	16	47	39	8
CEFTRIAXONA	114	111	3	47	36	11
VANCOMICINA	114	114	0	47	45	2
GENTAMICINA	114	103	11	47	31	16
ERITROMICINA	114	92	22	47	27	20
CIPROFLOXACINA	114	106	8	47	39	8
CLORAMFENICOL	114	90	24	47	37	10
RIFAMPICINA	114	104	10	47	30	17
COTROMOXAZOL	114	93	21	47	18	29
TETRACICLINA	114	41	73	47	3	44

Pentru a confirma diferențele observate am apelat la testul de semnificație statistică X^2, pentru o probabilitate de eroare mai mică sau cel mult egală cu 5% (p=0,05).

In cea mai mare parte diferențele care se pot observa în grafic au semnificație statistică, deci pot fi luate în seamă la cele mai multe dintre antibiotice.

Deşi valorile procentuale sunt diferite, comportamentul stafilococilor față de ciprofloxacină este, din punct de vedere statistic, identic la ambele loturi (valoarea p=0,054). Aceeaşi situație o întâlnim la ceftazidimă (p= 0,628)şi cefuroximă (p=0,118).

Am verificat într-o etapă ulterioară dacă comportamentul stafilococilor izolați în serviciul de traumatologie este diferit de acela al stafilococilor izolați doar în prelevatul "puroi" recoltat din acelaşi serviciu. Datele obținute sunt trecute în tabelul nr.10.

Testul X^2 confirmă că diferențele observate în rezistența stafilococului la antibiotice în "puroi" şi în "alte prelevate" sunt reale şi trebuie luate în considerație.

Pentru penicilină, ampicilină, amoxicilină + acid clavulanic, oxacilină valorile lui p sunt evident mai mari decât valoarea standard (p=0,05), diferențele fiind fără semnificație statistică.

Cu totul alta este situația pentru cefalosporine (cefuroxima şi ceftazidima, la limită pentru ceftriaxonă). Valorile obținute au semnificație, indicând efectul selectiv şi presor al acestora pentru selecția unor tulpini rezistente la această clasă de antibiotice.

Corelăm acest rezultat cu observația că în practica acestui serviciu cefalosporinele sunt cel mai mult utilizate, atât în tratamentul de primă intenție cât şi în profilaxia pre- şi post operatorie.

Trebuie să menționăm că pe un lot extins de studiu valorile pot fi mai puțin evidente. Oricum, chiar respectând recomandarea computerului, care ne indică "exacts limits prefered" concluziile sunt aceleaşi.

La limita semnificației se află vancomicina, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina, cloramfenicolul, rifampicina, cotrimoxazolul.

Stafilococcus aureus a reprezentat întotdeauna o problemă deosebită în patologie, atât în cea comunitară cât şi în cea nosocomială.

Prezența stafiloccocului în mediul spitalicesc este o realitate ce nu mai trebuie probată. Distribuția acestuia în produsele patologice este de asemenea o particularitate a fiecărui spital şi chiar serviciu clinic şi este influențată de caracterul patologiei, portajul de stafilococ în rândul personalului medical, al pacienților, de utilizarea corectă a metodelor de dezinfecție, sanitație etc.

BUAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Evoluția rezistenței la antibiotice a stafilococilor are de regulă un aspect bifazic: într-o primă etapă, la începutul introducerii unui nou antibiotic, curba rezistenței este abrupt ascendentă apoi, în a doua fază, curba are un aspect de platou sau mult mai discret ascendent, în care oscilațiile sunt moderate. Afirmația este susținută și de aspectul curbelor dimanicii rezistenței la unele antibiotice obținute de noi.

Acest aspect este și mai evident în graficul nr. 25 unde rezultatele pe ultimii ani indică "un platou relativ".

Alura curbei rezistenței este specifică fiecărui antibiotic în parte și depinde foarte mult de proveniența tulpinii de stafilococ, comunitară sau intraspitalicească, așa cum se poate observa în graficele nr. 26 și 27.

Valorile obținute de noi în investigarea rezistenței stafilococilor la antibiotice se încadrează în mare în valorile publicate în litaratură, atât în țară cât și în străinătate.

Trebuie să subliniez aici că este extrem de greu și poate nici nu este util să se facă comparații între rezultatele obținute în diferite unități spitalicești, areale sau chiar zone geografice. Chiar între tulpinile izolate în spitalul investigat de noi există diferențe, semnificative statistic.

Alte criterii care reduc substanțial semnificația comparațiilor între diferite studii statistice sunt variabilele care contribuie la dezvoltarea rezistenței microbiene la antibiotice: profilul serviciului medical, vârsta și starea generală a pacienților, dotarea laboratoarelor de microbiologie, experiența microbiologilor etc.

Din aceste considerente, rezistența la antibiotice, mai ales la agenții patogeni cu largă circulație, sum sunt stafilococii, este o particulariatate a spitalului sau unității medicale respective. Putem afirma, citându-l pe prof. Buiuc, că populația microbiană dintr-un spital acționează ca un organism multicelular.

Un aspect particular observat este acela al rezistenței stafilococilor la vancomicină. După cum se poate observa în tabelele nr. 8 și 9 sunt raportate tulpini de stafilococ auriu rezistente la vancomicină.

Situația impune o foarte atentă investigație deoarece rezistența stafilococilor la vancomicină este încă rară la noi în țară.

De asemenea la nivel mondial incidența tulpinilor de stafilococ auriu rezistent la vancomicină este redusă.

Se impune în atare situații investigarea atentă a tulpinilor suspectate, urmărind criteriile NCCLS pentru testarea sensibilității microbiene la vancomicină.

În spital nu se urmărește meticilino-rezistența tulpinilor de stafilococ, informație utilă pentru urmărirea circulației tulpinilor de spital.

Dever și col. conchid în urma unei investigații extrem de laborioase efectuată atât asupra pacienților cât și a personalului spitalului privind portajul și circulația tulpinilor de stafilococ auriu precum și asupra profilului rezistenței acestora la antibiotice că antibiograma nu oferă suficiente date pentru efectuarea unor studii epidemiologice ceea ce impune realizarea tipării moleculare a tulpinilor circulante.

O altă problemă extrem de importantă este aceea a obținerii unor informații cât mai apropiate de realitate. Mă refer aici la evaluarea eficacității antibioticelor prin metoda CMI și a CMB. Aceste investigații permit evaluarea extrem de corectă a susceptibilității agentului patogen la antibioticul utilizat. O modalitate modernă, mai facilă este aceea a E-testului, care permite evaluarea corectă a rezistenței microbiene și implicit utilizarea rațională a antibioticelor. În plus permite elaborarea unor strategii corecte de limitare a rezistenței microbiene.

În concluzie putem afirma că la nivelul spitalului circulă tulpini de Staphylococcus aureus cu rezistențe crescute față de acțiunea multor dintre antibioticele testate și utilizate în clinică.

Sunt izolate și identificate tulpini a căror rezistență la antibiotice este remarcabilă și sugerează natura lor intraspitalicească.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru supravegherea epidemiologică este necesară caracterizarea fenotipică şi lizotipică a tulpinilor de stafilococ auriu izolate şi identificate.

Specia Staphylococcus epidermidis

În intervalul luat în studiu au fost izolate şi identificate în laboratorul de microbiologie al spitalului 1.261 de tulpini de Staphylococcus epidermidis. Prelevatele în care au fost izolate tulpini de Staphylococcus epidermidis sunt prezentate în tabelul 8.

Tabel nr. 8 Distribuţia tulpinilor de Staphylococcus epidermidis după prelevat

PRELEVAT	NR. TULPINI IZOLATE SPITAL	NR. TULPINI IZOLATE POLICL
Hemocultură	93	16
Puroi	186	31
Secreţie plagă	339	34
Secreţie tub de dren	14	7
Secreţie otică	138	43
Secreţie conjunctivală	156	57
Exudat nazal	269	97
Secreţie genitală	43	18
Alte	23	2
Total	1261	305

Am analizat repartiţia tulpinilor de epidermidis izolate în funcţie de serviciul clinic care solicită examenul microbiologic, corelat cu prelevatul în care au fost izolate tulpinile. Informaţiile obţinute sunt utile deoarece ele ne orientează spre sursa cea mai reprezentativă de tulpini şi implicit spre serviciul care poate prezenta cel mai înalt risc pentru infecţii nosocomiale.

Analizând rezultatele semnalăm de la început ponderea mare a tulpinilor izolate din ambulator.

Distribuţia prelevatelor acoperă practic toate sectoarele clinice ale spitalului ceea ce arată că stafilococii sunt germeni cu largă răspândire. Această situaţie este normală ea fiind explicabilă prin faptul că Staphylococcus epidermidis este un rezident normal al vestibulului nazal şi la tegumentelor, prezent mai ales în foliculii piloşi şi în glandele sudoripare.

Am analizat în continuare repartiţia prelevatelor în care s-au izolat tulpini de stafilococ epidermidis, în funcţie de anumite secţii clinice.

Astfel examenul microbiologic al prelevatului puroi este solicitat mai ales de serviciile chirurgicale.

Serviciile chirurgicale sunt practic cele care trimit 90% din prelevatul puroi la laboratorul de microbiologie, restul de 10% provenind din ambulatorul spitalului.

Analizând distribuţia examenului hemocultură în funcţie de secţie se constată că secţiile chirurgicale furnizează peste 90% din acest specimen, în care se izolează stafilococ epidermidis.

Această distribuţie se păstrează pentru toate prelevatele, mai puţin exudat nazal, unde ponderea maximă o are serviciul ambulator. De asemenea prelevatele secreţie conjunctivală şi secreţie otică sunt trimise la laborator de secţiile de profil, oftalmologie, respectiv O.R.L.

Am făcut o comparaţie între distribuţia pe prelevate a tulpinilor de Staphylococcus aureus şi Staphylococcus epidermidis. Se constată că epidermidis-ul este mai frecvent izolat în hemocultură, secreţie nazală, secreţie otică şi puroi.

Comportamentul faţă de antibiotice al tulpinilor de Staphylococcus epidermidis este prezentat în tabelul nr. 9.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 9 Comportamentul față de antibiotice al tulpinilor de Staphylococcus epidermidis

ANTIBIOTIC	1993			1996			1999		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
PEN	482	80	402	474	252	422	305	27	278
AMP	482	93	389	474	66	408	305	52	253
ACV	482	429	53	474	435	39	305	235	70
OXA	482	368	114	474	373	101	305	223	82
CFU	482	428	54	474	416	58	305	262	43
CFX	-	-	-	474	417	57	305	256	49
IMI	-	-	-	-	-	-	305	217	88
GEN	482	386	96	474	398	76	305	249	56
CLF	482	375	107	474	389	85	305	247	58
ERT	482	274	208	474	208	266	305	162	143
RIF	482	347	135	474	327	147	305	238	67
CIP	482	-	-	474	434	40	305	271	34
CTX	482	329	154	474	399	175	305	171	134
VNC	-	-	-	-	-	-	305	301	4

Din analiza rezultatelor prezentate mai sus se remarcă nivele înalte ale rezistenței tulpinilor circulante în spital față de betalactamine, şi în mod particular nivelele înalte ale rezistenței față de cefalosporine, comparativ cu datele raportate de alți autori. Rezistența la peniciline oscilează în funcție de substanță, nivele foarte înalte fiind înregistrate la penicilină şi ampicilină, între 80% şi 90%.

Dinamica rezistenței cunoaşte o tendință ascendentă pentru asocierea amoxicilină+acid clavulanic.

Rezistența la oxacilină are un aspect de platou, cu nivele comparativ egale cu cele raportate de Codiță.(graficul nr. 35).

Remarcăm în mod deosebit rezistența tulpinilor de epidermidis izolate la unele antibiotice considerate ca fiind antibiotice de rezervă sau cu indicații foarte stricte. Sunt incluse în această categorie cloramfenicolul şi rifampicina.

Rezistența la cefalosporine este în creştere, fenomen legat direct de utilizarea excesivă a acestora, atât în clinică cât şi în ambulator.

Nivele înalte de rezistență sunt înregistrate şi la cotrimoxazol, tendința fiind, pentru datele obținute de noi, ascendentă.

Remarcăm izolarea unei tulpini de stafilococ epidermidis "rezistentă la vancomicină". Din păcate nu intră în practica laboratorului să investigheze mult mai atent asemenea situații, de aceea asemenea rerultate trebuie primite cu circumspecție fără o verificare şi confirmare a rezultatelor din partea unui laborator de referință.

Am analizat în continuare profilul rezistenței la antibiotice a tulpinilor de epidermidis în funcție de prelevat şi de proveniența acestuia pentru a vedea dacă există diferențe între nivelele de rezistență.

In acest scop am analizat tulpinile izolate în ambulator, comparativ cu cele izolate în serviciul de traumatologie, din prelevatele puroi si secreție tub de dren, în tabel nr. 10.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 10. Rezistenta la antibiotice a tulpinilor de Staphylococcus epidermidis izolate in prelevatele puroi si secretie tub de dren, traumatologie versus ambulator

ANTIBIOTIC	AMBULATOR			TRAUMATOLOGIE		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
PEN	8	0	8	23	0	23
AMP	8	2	6	23	2	21
ACV	8	5	3	23	9	14
OXA	8	5	3	23	7	16
CFU	8	6	2	23	15	8
CFX	8	6	2	23	17	6
IMI	8	6	2	23	16	7
GEN	8	7	1	23	12	11
CLF	8	5	3	23	16	7
ERT	8	3	5	23	9	14
RIF	8	5	3	23	14	9
CIP	8	6	2	23	18	5
CTX	8	4	4	23	6	17
VNC	8	8	0	23	22	1

Datele obținute indică diferențe statistic semnificative ($p<0,05$) pentru unele antibiotice, cum ar fi ampicilina,asociația amoxicilină+acid clavulanic, oxacilina, gentamicină, cotrimoxazol.

Copnsiderăm că valorile rezistenței la antibiotice a tulpinilor de Staphylococcus epidermidis izolate şi identificate în spital indică implicarea acestei specii bacteriene în patologia de spital iar fenomenul rezistenței la antibiotice este într-o dinamică evidentă. Acest aspect trebuie avut în vedere mai ales la pacienții care sunt expuşi unui risc crescut de infecție cu stafilococul epidermidis, adică bolnavii cateterizați venos, pacienții imobilizați la pat timp îndelungat, cu traumatisme multiple sau cei cu arsuri de gradul III sau IV.

Implicarea stafilococilor epidermidis în infecțiile de cateter se datorează prezenței unui factor de aderență, slim factor, care permite germenului să adere la materialele plastice. Acest slim factor are şi funcția de a proteja bacteria de fagocite sau de agresiunea altor bacterii cu care aceasta intră în competiție şi chiar față de unele antibiotice. Studiile efectuate de Svenson şi col. şi de Schwank şi col. subliniază efectul protector al slim factor-ului care a permis dezvoltarea şi creşterea coloniilor de epidermidis rezistent la oxacilină în straturi suprapuse, în pofida prezenței unor antibiotice recunoscute pentru activitatea antistafilococică: amikacina, levofloxacina, rifampicina, imipenemul.

Importanța practică rezidă în respectarea tuturor regulilor de asepsie şi antisepsie în timpul manevrelor invazive care pot fi insoțite de contaminarea cateterelor, sondelor etc cu stafilococi epidermidis în situația în care administrarea în scop profilactic a antibioticelor nu este întotdeauna eficientă.

In concluzie supravegherea circulației tulpinilor de Staphylococus epidermidis presupune aceleaşi măsuri specificate la stafilococul auriu, măsuri care sunt necesare oricărei supravegheri eficiente a circulației germenilor şi a infecțiilor nosocomiale într-un spital .

Specia Streptococcus pneumoniae

În perioada luată în studiu, în laboratorul spitalului au fost izolate şi identificate 212 tulpini de Streptococcus pneumoniae.

După cum se poate observa procentul cel mai mare este reprezentat de prelevatele spută şi exudat faringian, care reprezintă peste 60% din tulpinile izolate; remarcăm izolarea acestui patogen în prelevatul secreție otică.

Distribuția izolatelor după secția clinică este următoarea: serviciul boli interne(MED) 42 de tulpini, secția pneumologie-ftiziologie (PNEUM) 52 de tulpini, chirurgia toracică (CHIR.TOR) 39 de tulpini, serviciul ATI 19 tulpini, sectia ORL 23 tulpini, ambulatorul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

spitalului 19 tulpini, secţiile de traumatologie şi chirurgie generală 8 şi respectiv 9 tulpini fiecare.

Comportamentul tulpinilor de penumococ izolate şi identificate faţă de antibiotice este inregistrat in tabelul nr. 11.

Tabelul 11. Comportamentul faţă de antibiotice al tulpinilor de Streptococcus pneumoniae

ANTI-BIOTIC	1993			1996			1999		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
PEN	74	65	9	95	74	21	43	29	14
AMP	74	67	7	95	77	18	43	36	7
ACV	74	71	3	95	87	8	43	39	4
ERT	74	61	13	95	72	23	43	31	12
RIF	74	58	16	95	76	19	43	31	13
CLF	74	70	4	95	86	9	43	39	4
OFL	74	-	-	95	93	2	43	39	5
CIP	74	-	-	95	92	3	43	38	4
TET	74	53	21	95	76	19	43	28	15

Valorile observate în această anchetă confirmă dinamică ascendentă a rezistenţei tulpinilor de pneumococ la penicilină, observată şi raportată pentru prima dată la inceputul anilor 1970. La începutul anilor '70 au fost semnalate primele tulpini de streptococ cu sensibilitate mai scăzută la penicilină în Australia şi apoi în Africa de Sud, pentru ca în anii următori să fie identificate tulpini înalt rezistente la penicilină şi multirezistente şi în Romania.

Cel mai eficace antibiotic identificat de noi ar fi fluorochinolonele, apoi asocierea amoxicilina + acid clavulanic, activă pe 90% din tulpinile izolate, apoi eritromicina cu o eficienţă de 67%. Penicilina G a fost creditată cu activitate bactericidă asupra a 74% din tulpinile de pneumococ izolate şi testate.

Numeroase studii, comunicate atât în ţară cât şi străinătate indică extinderea rezistenţei tulpinilor de Streptococcus pneumoniae.

Valorile raportate de noi sunt asemănătoare cu cele referitoare la dezvoltarea rezistenţei la penicilină, considerată în urmă cu 30 de ani ca antibiotic de elecţie în infecţiile pneumococice. Valorile obţinute de noi confirmă tendinţa ascendentă a rezistenţei la penicilină.

Dorobăţ raportează rezistenţa la penicilină în dinamică: în 1993, 13% din tulpini rezistente la penicilină, în 1996, 20% tulpini rezistente iar în 1999 identifică 45% din tulpinile de pneumococ rezistente la penicilină; deci antibiograma devine obligatorie. Datele noastre sunt asemănătoare cu cele raportate de Weber şi col.

Aceeaşi tendinţă de creştere a nivelelor de rezistenţă la antibiotice se poate observa şi pentru celelalte antibiotice investigate, cu menţionarea expresă a eritromicinei şi a fluorochinolonelor, antibiotice extrem de folosite in practica ambulatorie.

Nu trebuie uitat că eritromicina ca de altfel şi celelalte macrolide sunt utilizate ca alternativă la pacienţii alergici la penicilină, valori care sunt asemănătoare cu cele publicate de Pană şi col., Ungureanu şi col. şi Podani şi col. Numărul mic de tulpini izolate de noi nu ne permite să detaliem studiul nostru în funcţie de prelevat sau serviciul clinic.

Datele obţinute de noi confirmă existenţa tulpinilor de Streptococcus pneumoniae rezistente la antibiotice şi tendinţa ascendentă a evoluţiei rezistenţei. Această observaţie este extrem de utilă pentru supravegherea mult mai atentă a circulaţiei în spital a tulpinilor de pneumococ şi implicarea lor în infecţiile nosocomiale.

Specia Escherichia coli

BCU "IULIU HAŢIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

Au fost izolate 3816 tulpini de Escherichia coli; cele mai multe tulpini au fost izolate din urina recoltată de la pacienți. Cele mai multe uroculturi, respectiv 24% provin din ambulatorul spitalului (graficul nr. 11).

Repatiția după prelevat a tulpinilor de colibacil izolate în anul 1999 este prezentată în tabelul nr. 12.

Tabelul 12. Prelevatele în care s-a izolat Escherichia coli

Prelevat	E.coli
URINA	1001
SECREȚII GENITALE	122
PUROI	27
HEMOCULTURA	8
SECREȚII PLAGA	57
LICHID PLEURAL	8
SPUTA	19
TUB DREN	11
ALTE	6
TOTAL	1259

Remarcăm încă de la început ponderea foarte mare a prelevatului urocultură, aspect explicat anterior prin aceea că ambulatorul spitalului asigură şi dispensarizea bolnavilor cronici şi invetigațiile de laborator pentru medicii de familie arondați.

Antibioticele testate pentru eficacitatea asupra tulpinilor de colibacil izolate acoperă întreaga gamă de produse antimicrobiene utilizate în tratamentul infecțiilor provocate de acest agent patogen.

Am exemplificat comportamentul față de antibiotice a tulpinilor de coli prezentând cel mai des utilizate substanțe în spital dar şi în practica ambulatorie. În general valorile obținute şi comunicate de noi nu diferă substanțial de cele comunicate de alți cercetători din țară.

Unele antibiotice prezintă variații cărora inca nu le putem găsi explicații. De exemplu variația rezistenței la cloramfenicol şi cotrimoxazol. Vom detalia în continuare dinamica rezistenței colibacililor față de unele antibiotice.

Rezistența raportată de laborator la cefalosporine o considerăm foarte mare comparativ cu alte statistici comunicate în literatură. De exemplu, Poiată şi col. raportează niveluri de rezistență mult mai mici decât cele găsite de noi, între 1,8 şi 4%. Una dintre explicații ar fi utilizarea excesivă a acestor produse medicamentoase în serviciile chirurgicale mai ales ca terapie de primă intenție în aproape toate infecțiile dar şi în profilaxia pre- şi post operatorie.

In chirurgia intraabdominală, cu deschiderea peritoneului se administrează preoperator 1g ceftriaxonă sau 1 g ceftazidimă, urmată de 2 – 3 administrări postoperator, indiferent dacă există sau nu semne clinice de infecție, ceea ce ni se pare gresit.

Niveluri ridicate de rezistență a tulpinilor de E. coli izolate sunt înregistrate şi la chinolone. Această familie de substanțe antimicrobiene este utilizată pe scară largă, atât în clinică cât şi în tratamentul ambulator, ceea ce explică dinamica ascendentă a rezistenței. Coman şi col., identifică 8% din tulpinile de Escherichia coli izolate rezistente la fluorochinolone.

Pentru a identifica originea tulpinilor rezistente ar fi trebuit să putem prelucra informații legate de caracterizarea biochimică a tulpinilor, sau, tiparea fagică acestora şi circulația lor în spital. În lipsa acestor date, prin neexecutarea testelor respective am încercat să urmărim fenomenul rezistenței bacteriene şi eventuala circulație a tulpinilor urmărind profilul rezistenței tulpinilor de colibacil izolate în unele specimene şi în funcție de serviciul care solicită examenele microbiologice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Am ales ca referință tulpinile izolate în ambulatorul spitalului, considerând că prelevatele recoltate aici sunt de la pacienți cu infecții acute, intercurente şi care nu au fost tratate cu antibiotice.

Am considerat util pentru studiul nostru să alegem din totalul tulpinilor de Escherichia coli izolate doar acele tulpini care nu au fost identificate din urocultură, dat fiind procentul mare de uroculturi efectuat în ambulator pentru dispensarizarea bolnavilor cronici. Aceeaşi selecție am efectuat-o şi pentru tulpinile izolate în clinică, respectiv serviciul de traumatologie. Din totalul tulpinilor izolate în ambulator am selecționat 178 de tulpini de Escherichia coli, identificate în secreții otice, secreții oculare, spută, materii fecale, a căror comportament față de antibiotice este detaliat în tabel. Din tulpinile izolate în clinica de traumatologie am selecționat 38 de tulpini, ale căror rezistență față de antibiotice poate fi găsită tot în tabel 13.

Tabel nr. 13. Comportamentul față de antibiotice al tulpinilor de E.coli, Traumatologie versus ambulator

ANTIBIOTIC	SIMBOL	AMBULATOR			TRAUMATOLOGIE		
		TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
Ampicilina	AMP	178	110	68	38	18	20
Amoxicilină+Ac Clav.	ACV	178	153	25	38	22	16
Ceftriaxona	CFX	178	151	27	38	30	8
Ceftazidima	CFT	178	148	30	38	29	9
Gentamicina	GEN	178	145	33	38	26	12
Amikacina	AMK	178	149	29	38	28	10
Cloramfenicol	CLF	178	127	51	38	20	18
Tetraciclina	TET	178	87	91	38	4	34
Cotrimoxazol	CTX	178	119	59	38	17	21
Acid nalidixic	NAL	178	114	64	38	23	15
Ciprofloxacina	CIP	178	157	21	38	30	8
Ofloxacina	OFL	178	159	19	38	31	7
Colistin	COL	178	171	7	38	34	4

Prin testul X^2 am verificat dacă diferențele observate în rezistența tulpinilor de coli izolate în ambulator față de cele izolate în secția de traumatologie sunt semnificative din punct de vedere statistic, pentru p= 0,05.

Testele indică absența semnificației statistice pentru toate antbioticele analizate, mai puțin asocierea amoxicilină + acid clavulanic.

Deşi testul de semnificație nu este concludent putem, pe baza indicațiilor valorilor "riscului relativ" să considerăm că valorile obținute trebuie analizate mai atent prin schimbarea variabilelor. Dacă vom obține valori semnificative din punct de vedere statistic putem emite concluzii pertinente pe baza tuturor valorilor observate. În acest scop am ales alte loturi de studiu aşa cum se poate vedea în tabelul nr. 14

BCU IAŞI "GR. T. POPA" UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 14. Comportamentul față de antibiotice al tulpinilor de E.coli izolate în prelevatul "puroi"

ANTIBIOTIC	PUROI SPITAL			PUROI-TRAUMATOLOGIE		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
Ampicilina	15	2	13	12	1	11
Amoxicilină+Acid Clavulanic	15	12	3	12	4	8
Ceftriaxona	15	12	3	12	7	5
Ceftazidima	15	11	4	12	6	6
Gentamicina	15	7	8	12	7	5
Amikacina	15	9	6	12	7	5
Cloramfenicol	15	7	8	12	5	7
Tetraciclina	15	2	13	12	0	12
Cotrimoxazol	15	6	9	12	3	9
Acid nalidixic	15	7	8	12	4	8
Colistin	15	10	5	12	7	5
Ofloxacina	15	9	6	12	8	4
Colistin	15	14	1	12	10	2

Am considerat că în puroiul provenit din serviciul clinic pot fi identificați germeni mai rezistenți la antibiotice decât în puroiul recoltat de la pacienții ambulatori.

Nici în această situație nu am obținut diferențe semnificative din punct de vedere statistic între valorile rezistenței microbiene la colibacili. In urma acestor rezultate am mai efectuat o comparație între germenii izolați în același serviciu, luând ca termen de referință tulpinile de colibacil izolate în puroi pe care le-am comparat, din punct de vedere al rezistenței manifestate față de antibiotice. Loturile studiate din acest punct de vedere, se regăsesc în tabelul 15.

Tabelul nr. 15. Comportamentul față de antibiotice al tulpinilor de Escherichia coli izolate în "Traumatologie" versus tulpinile izolate în prelevatul "puroi-traumatologie"

ANTIBIOTIC	TRAUMATOLOGIE (MINUS PUROI)			PUROI - TRAUMATOLOGIE		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
Ampicilina	26	17	9	12	1	11
Amoxicilină + Acid Clavulanic	26	18	8	12	4	8
Ceftriaxona	26	23	3	12	7	5
Ceftazidima	26	23	3	12	6	6
Gentamicina	26	19	7	12	7	5
Amikacina	26	21	5	12	7	5
Cloramfenicol	26	15	11	12	5	7
Tetraciclina	26	4	22	12	0	12
Cotrimoxazol	26	14	12	12	3	9
Acid nalidixic	26	19	7	12	4	8
Colistin	26	23	3	12	7	5
Ofloxacina	26	23	3	12	8	4
Colistin	26	24	2	12	10	2

UMF IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Testele de semnificaţie statistică arată că diferenţele înregistrate în nivelurile de rezistenţă la antibiotice ale tulpinilor de Escherichia coli izolate în lotul puroi –traumatologie versus lotul traumatologie minus puroi sunt semnificative, nivelul cel mai înalt de rezistenţă fiind, aşa cum era de aşteptat al lotului puroi-traumatologie.

Datele obţinute sunt interesante nu atât prin faptul că indică, la fel ca şi pentru ceilalţi germeni analizaţi, o creştere a nivelului rezistenţei la antibiotice a tulpinilor de Escherichia coli dentificate în spital, cât mai ales prin variaţia mică a nivelului de rezistenţă, atât la tulpinile considerate comunitare, izolate în ambulator cât şi la tulpinile izolate în spital, în servicii cu risc înalt pentru infecţiile nosocomiale, aşa cum este serviciul de traumatologie.

Cauzele care pot conduce la acest aspect oarecum particular, ar putea fi următoarele:

- la nivel comunitar circulă tulpini cu niveluri de rezistenţă ridicată, apărute în urma consumului excesiv şi necontrolat din punct de vedere medical al antibioticelor cu spectru larg. Acest aspect este sugerat de niveluri apropiate de rezistenţă (din punct de vedere statistic) la acest tip de antimicrobiene. Garau şi col. descriu un fenomen similar, a cărui explicaţie o găsesc tot în administrarea cu mult prea multă uşurinţă a antibiticelor cu spectru larg şi chiar ultralarg în infecţii urinare la pacienţi din ambulator.
- Tulpinile circulante de Escherichia coli care nu sunt izolate în urină sau în tubul digestiv pot avea profile de rezistenţă asemănătoare deoarece ponderea infecţiilor provocate de ele este foarte mică şi în consecinţă ele capătă rezistenţă în alte circumstanţe. Cel puţin teoretic acele tulpini izolate în secreţii conjunctivale, secreţii nazale, în faringe etc. sunt tulpini endogene, iar profilul rezistenţei lor este dat de "experienţa gazdei lor din punct de vedere al contactului cu antibioticele". Aceeaşi interpretare a fenomenului de rezistenţă la antibiotice a tulpinilor de Escherichia coli o găseşte şi Nemet.
- Modelul ales de noi pentru studiu nu este cel recomandat pentru evidenţierea fenomenului urmărit.

Analizând mecanismele şi fenomenul rezistenţei bacteriene la antibiotice, cu referiri la specia Escherichia coli, Stapleton şi col. emit ipoteza că pentru un antibiotic există un nivel maxim al rezistenţei care se manifestă în platou şi care se poate menţine o perioadă lungă de timp.

Rezultatele noastre arată că tulpinile de colibacil sunt rezistente la antibioticele cu spectru larg dar sunt rezistente şi la antibiotice utilizate numai în spital, cum ar fi aminoglicozidele.

Fenomenul este îngrijorător şi trebuie să fie supravegheat îndeaproape, mai ales la nivelul spitalului luat în studiu.

Datele obţinute de noi sunt asemănătoare cu datele publicate de unii cerctători români. Rugină şi col. identifică o rezistenţă la aminoglicozide a colibacilului între 26 şi 70%, în funcţie de substanţa testată. Poiată raportează un nivel de rezistenţă la fluorochinolone apropiat de cel identificat de noi.

Un studiu extrem de interesant efectuat de Lăcătuş şi col. raportează o situaţie particulară. Tulpinile de colibacil izolate şi identificate de la pacienţi sunt mai sensibile la unele antibiotice decât tulpinile izolate din apele reziduale, unde se remarcă niveluri înalte de rezistenţă la ampicilină 62%, la cefazolină 30%, cloramfenicol 30%; niveluri ridicate de rezistenţă la antibiotice au prezentat şi tulpinile de colibacili izolate din branhiile peştilor. Aceste rezultate arată că în afara unităţilor medicale circulă tulpini microbiene din ce în ce mai rezistente la antibiotice, rezulatate ce confirmă datele obţinute şi raportate de Garau.

Niveluri înalte de rezistenţă sunt comunicate şi în cadrul programului de supraveghere a rezistenţei la antibiotice, "Synergid Microbial Assessment of Resistance Trends Study, 1996-1997" (SMART).

Rezultatele obţinute de noi, comparabile cu cele din literatură confirmă dezvoltarea rezistenţei la antibiotice a tulpinilor de colibacil şi extinderea în afara spitalelor a fenomenului de rezistenţă.

Specia Klebsiella pneumoniae

Au fost izolate şi identificate 1.179 tulpini de Kl. pneumoniae, distribuite pe cei trei ani luaţi în studiu şi după prelevate conform tabelului nr. 16.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul nr. 16. Distribuția tulpinilor de Kl. pneumoniae după prelevat

PRELEVAT	1993	1996	1999	TOTAL
urina	175	236	192	603
secretie nazala	9	16	20	45
puroi	2	3	5	10
secretie plaga	22	32	16	70
exudat faringian	21	29	41	91
sputa	118	98	92	308
lichid pleural	2	7	4	13
secretie vaginala	10	12	4	26
alte	6	4	3	13
TOTAL	365	437	377	1179

Tulpinile izolate din prelevatele considerate ca provenind de la bolnavii cu infecții nosocomiale reprezintă mai puțin de 2%. Aceasta deoarece 60% din prelevatele puroi şi secreție plagă provin din serviciul de dermatologie, pacienții fiind internați cu diagnostic de piodermite sau dermite suprainfectate.

Ponderea tulpinilor de Klebsiella pneumoniae în etiologia infecțiilor nosocomiale nu pare să fie mare.

Analizând comportamentul față de antibiotice al tulpinilor de Klebsiella pneumoniae izolate şi identificate în laboratorul spitalului pe parcursul celor trei ani analizați (graficul nr.54) remarcăm niveluri destul de ridicate ale rezistenței, comparativ cu cele raportate de unii cercetători.

Surprind nivelurile ridicate ale tulpinilor la antibiotice noi introduse în practica curentă la momentul respectiv cum ar fi cefalosporinele de generația a III-a sau fluorochinolonele.

Datorită heterogenității probelor am apelat la compararea generală a rezistenței tulpinilor de Klebsiella pneumoniae izolate şi identificate în urină şi în prelevatul "secreție plagă".

In tabelul nr. 16 sunt înregistrate numeric tulpinile de klebsiella izolate şi identificate în urină şi în prelevatul "secreție plagă" şi tulpinile rezistente la antibioticele a căror acțiune asupra germenilor din această specie a fost testată.

Tabelul nr. 17. Rezistența tulpinilor de Kl. pneumoniae izolate în urină şi secreție plagă

	PLAGA TOTAL	PLAGA REZ	URINA TOTAL	URINA REZ
AMP	16	7	192	79
ACV	16	7	192	54
CFX	16	5	192	44
CFT	16	3	192	40
GEN	16	5	192	34
AMK	16	4	192	21
CLF	16	3	192	31
TET	16	13	192	140
CTX	16	12	192	92
NAL	16	7	192	73
CIP	16	6	192	46
OFL	16	6	192	45

Valorile calculate ale lui p sunt mai mari de 0,05, dar datorită diferenței mari între loturi este recomandată interpretarea conformă cu datele obținute.

Am urmărit în dinamică evoluția rezistenței tulpinilor de Klebsiella pneumoniae la unele antibiotice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Față de betalactamine și dintre acestea față de cefalosporine constatăm o tendință de creștere a rezistenței.

Dezvoltarea unor mecanisme complexe de rezistență a tulpinilor de klebsiele dintre care se remarcă formarea de betalactamaze cu spectru extins, a adus niveluri destul de înalte ale rezistenței acestei specii la betalactamine, situație semnalată din ce în ce mai frecvent în litaratură.

Fluorochinolonele sunt și ele mai puțin active pe klebsiele în anul 1999 comparativ cu ceilalți ani.

Utilizarea din ce în ce mai intensă a fluorochinolonelor atât în spitale dar mai ales în ambulator se reflectă în creșterea rezistenței la ciprofloxacină, la ofloxacină sau alte fluorochinolone.

Se poate observa relativul "platou" al rezistenței la cotrimoxazol, care însă este aproape de 50% ceea a ce impune testarea sensibilității tulpinilor la acest antibiotic, ca de altfel la toate celelalte antimicrobiene.

Niveluri mai reduse de rezistență la antibiotice decât cele identificate de noi, sunt comunicate de cercetători români, cu niveluri de rezistență a tulpinilor de Klebsiella pneumoniae la cefalosporine de generația a II-a și a III-a cuprinse între 5-8%, iar la fluorochinolone între 4-10%.

Rezultate asemănătoare cu cele prezentate noi comunică Constantiniu și col. și Poiată și col., Rugină și col. comunică niveluri înalte de rezistență la fluorochinolone, între 8-15% și la aminoglicozide, de 50% pentru kanamicină, 60% pentru tobramicină, 25% pentru gentamicină și 12% pentru amikacină.

Literatura de specialitate semnalează creșterea prevalenței infecțiilor nosocomiale cu Klebsiella pneuminiae. Korvick identifică tulpini de Klebsiella implicate în infecții nosocomiale cu punct de plecare urina în 28%, căile biliare în 12% din cazuri; pneumoniile recunosc etiologia klebsielelor în 10% din cazuri și în 9% din infecțiile nosocomiale intraabdominale.

Pittet și col. subliniază în studiul lor locul al doilea ocupat de Klebsiella pneumoniae, după Escherichia coli, în etiologia bacteriemiilor nosocomiale cu bacili gram negativi.

In studiul SENTRY klebsielele au reprezentat 7% din totalul germenilor izolați în hemoculturi și implicați în bacteriemii de origine nosocomială. În același studiu se comunică niveluri de rezistență la cefalosporine între 10 și 15%, la amionoglicozide între 4 și 10%. Trebuie subliniată eficacitatea crescută a tetraciclinei, se raportează doar 16% tulpini rezistente; cotrimoxazolul este creditat cu eficacitate asupra a 85% din tulpinile izolate de klebsielle. Același studiu raportează niveluri foarte ridicate de activitate a fluorochinolonelor asupra klebsiellelor, între 96–97%.

Datele prezentate mai sus indică o mare diversitate a rezultatelor obținute în diferite instituții medicale, chiar din zone geografice identice. Toate acestea conduc la necesitatea creeării unui sistem unitar de evaluare a fenomenului, cel puțin într-o anumită zonă/regiune. Putem afirma că la nivelul spitalului luat în studiu există tulpini circulante de Klebsiella pneumoniae care manifestă rezistență față de antibiotice, mai ales față de fluorochinolone și aminoglicozide.

Trebuie amintită și incidența crescută a tulpinilor de Klebsiella pneumoniae în prelevatele recoltate din secțiile de traumatologie și ATI și care sugerează circulația unor tulpini selecționate și implicate probabil în infecții nosocomiale. Această situație impune realizarea unei supravegheri active a circulației germenilor în sectoarele cu risc crescut pentru infecții nosocomiale.

Specia Proteus mirabilis

Genul Proteus este reprezentat în studiul nostru de specia Proteus mirabilis. Au fost izolate și identificate 358 de tulpini, distribuția tulpinilor după prelevat este prezentată în tabelul nr. 18.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 18. Distribuția tulpinilor de Proteus mirabilis după prelevat

Prelevat	Global spital	Policlinica
Urină	253	74
Secreție otică	16	7
Secreție nazală	11	5
Secreție plagă	24	7
Secreție tub dren	8	1
Puroi	7	5
Spută	18	9
Secreție conjuntivală	21	8
Total	358	116

Se observă că urina este specimenul în care proteusul este cel mai frecvent izolat.

Distribuția izolatelor după prelevat nu diferă semnificativ față de distribuția globală. Se poate observa că serviciul care se confruntă cel mai des cu această specie bacteriană este cel de urologie, urmat de cel de ginecologie și de secția de boli interne. Din datele oferite de reprezentarea grafică remarcăm ponderea mare a prelevatelor puroi, secreție plagă și secreție tub dren la serviciul de terapie intensivă.

Un alt aspect oarecum surprinzător este acela al ponderii pe care o au prelevatele secreție nazală și secreție otică, știindu-se că proteus-ul nu este un patogen al acestor regiuni anatomice.

Analizând comportamentul față de antibiotice a tulpinilor de Proteus mirabilis izolate și identificate pe perioada analizată am obținut rezultatele ilustrate în tabelul 19.

Tabel 19. Comportamentul față de antibiotice al tulpinilor Pr..mirabilis

ANTIBIOTIC	1993			1996			1999		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
AMP	114	73	41	128	77	51	116	62	54
ACV	114	91	23	128	98	30	116	82	34
TIC	-	-	-	-	-	-	116	113	3
PIP	-	-	-	-	-	-	116	84	32
CFX	-	-	-	128	113	15	116	111	5
CFU	114	102	12	128	102	26	116	104	12
IMI	-	-	-	-	-	-	116	114	2
GEN	114	95	19	128	105	23	116	96	20
RIF	114	78	36	128	112	16	116	107	9
CLF	114	97	17	128	106	22	116	105	11
CIP	114	104	10	128	114	14	116	102	14
OFL	-	-	-	128	119	9	116	106	10
TET	114	13	101	128	17	111	116	14	102
CTX	114	89	25	128	93	35	116	95	21

După cum se observă în grafic nivelurile de rezistență ale tulpinilor de Proteus mirabilis sunt mari la unele antibiotice cum ar fi tetraciclina, aspect raportat deja în literatură și care se datorează utilizării excesive a acestui antibiotic o lungă perioadă de timp.

La unele dintre antibioticele intrate în arsenalul terapeutic în ultimele două decade se observă o evoluție progresivă a rezistenței tulpinilor de proteus izolate și identificate în spital.

FOLIA I CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este cazul asocierii amoxicilină+acid clavulanic la care se constată o creştere a rezistenţei de la 20% în anul 1993 la 29%. Această evoluţie este paralelă cu cea a ampicilinei.

Aspecte particulare prezintă evoluţia rezistenţei tulpinilor de proteus la cefalosporine. La cefuroximă în anul 1996 se constată un "vârf" al rezistenţei comparativ cu ceilalţi ani; aceeaşi tendinţă o observăm şi la ceftriaxonă. Aspectul este în acelaşi timp în concordanţă cu unele date publicate în literatură.

Nemet şi col. identifică 18% din tulpinile de proteus izolate de ei ca fiind rezistente la ceftazidimă , valoare apropiată de cea obţinută de noi.

La fluorochinolone se constată o de creştere a rezistenţei. Remarcăm nivelul mai redus al rezistenţei tulpinilor de proteus raportat de laborator comparativ cu datele comunicate de alţi cercetători. Deac raportează 15% din tulpini rezistente la ofloxacină şi 22% din tulpini rezistente la ciprofloxacină.

Coman şi col. identifică 11% din tulpinile de Proteus mirabilis izolate ca fiind rezistente la ciprofloxacină.

Nivelul rezistenţei la tetraciclină este foarte înalt, până la 90% din tulpini fiind rezistente.

Rezistenţa la cotrimoxazol are valori cuprinse între 22 şi 28%. Dacă valorile rezistenţei la tetraciclină se încadrează în datele din literatură nu acelaşi aspect în observăm la cotrimoxazol. Nivelurile rezistenţei la cotrimoxazol publicate de Nemet de 86% tulpini rezistente şi Deac care identifică aprope 60% din tulpini rezistente sunt net superioare celor identificate de noi.

Pentru a vedea dacă există niveluri diferite ale rezistenţei tulpinilor de Proteus mirabilis în funcţie de prelevat am analizat tulpinile izolate şi identificate în urină 74 de tulpini, în prelevatul spută, 9 tulpini şi tulpinile izolate din prelevatul secreţie plagă, 7 tulpini. Distribuţia prelevatelor este prezentată în tabelul nr. 20.

Tabelul 20. Distribuţia tulpinilor de Proteus mirabilis izolate în functie de prelevat si sectia clinica

SECTIA	URINA	SPUTA	PLAGA
UROLOGIE	26	0	2
GINECOLOGIE	31	1	1
MEDICALA	5	2	0
AMBULATOR	6	4	0
CHIRURGIE	3	1	1
TRAUMATOLOGIE	2	0	1
ATI	1	1	2
TOTAL	74	9	7

Datorită distribuţiei extrem de diferită a tulpinilor de proteus izolate şi identificate în funcţie de serviciul clinic, şi a numărului mic de tulpini izolate, nu am putut analiza valorile rezistenţei la antibiotice şi în funcţie de acest parametru, deoarece valorile obţinute nu pot fi comparate statistic.

Este evident că rezistenţa tulpinilor izolate din prelevatul secreţie plagă este mai mare decât cea a tulpinilor izolate şi identificate din celelalte prelevate.

Testele de confidenţă indică diferenţe semnificative din punct de vedere statistic între lotul urină şi lotul plagă cu valori ale lui p între 0,001 şi 0,05 pentru ampicilină, amoxicilină+acid clavulanic, ticarcilină, ceftriaxonă, imipenem. Pentru celelalte antibiotice diferenţele nu au semnificaţie statistică, p>0,05. Putem interpreta acest rezultat ca fiind o expresie a tratamentului infecţiilor urinare în care cefalosporinele şi flourochinolonele sunt utilizate pe

BCU ISI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

scară largă, atât în ambulator cât şi în spital, înlocuind aminopenicilinele şi cotrimoxazolul în tratamentul infecţiilor urinare.

Fără a avea parte de o supraveghere la fel de atentă ca alte bacterii implicate în infecţiile nosocomiale, germenii din genul Proteus trebuie supravegheaţi cu mai multă atenţie deoarece, ca şi ceilalţi germeni investigaţi, pot provoca infecţii nosocomiale rezistente la tratamentul cu antibiotice.

Specia Enterobacter cloacae

În intervalul luat în studiu au fost izolate şi identificate 951 tulpini bacteriene din genul Enterobacter. Dintre acestea au fost izolate şi identificate 916 tulpini din specia Enterobacter cloacae respectiv 96,3%, restul de de 3,7% fiind reprezentat de tulpini din speciile Enterobacter aerogenes şi Enterobacter sakazaki.

În continuare vor fi prezentate datele referitoare doar la specia Enterobacter cloacae.

Repartiţia pe cei trei ani luaţi în studiu a tulpinilor de E. cloacae izolate şi identificate este de 916, distribuţia după prelevat a tulpinilor de enterobacter este prezentată în tabelul nr. 21.

Tabelul nr. 21. Distribuţia după prelevat a tulpinilor de Ent. cloacae

PRELEVAT	SPITAL	POLICLINICA
Urina	626	148
Plaga	72	25
Puroi	34	21
Genital	86	28
Sputa	31	2
Hemo	16	2
Nas	23	6
Otic	17	3
alte	11	6
TOTAL	916	241

Din datele prezentate se poate observa că prelevatul în care este cel mai frecvent izolată acească bacterie este urina, respectiv peste 60% din izolate. De asemenea germenul este relativ frecvent izolat în secreţii genitale, aproximatix 10%, în exudat faringian, spută, secreţii otice şi oculare. Se remarcă de asemenea prezenţa tulpinilor de enterobacter în secreţii plagă şi puroi, respectiv 12% din totalul tulpinilor.

Am analizat separat distribuţia tulpinilor izolate în prelevate unde remarcăm o pondere mai mare a specimenelor puroi şi secreţie plagă în care s-a izolat acest germen. Constatăm o creştere a ponderii acestor prelevate de la 12% la 19%, care indică implicarea germenului în infecţii ce pot fi de cauză nosocomială.

Am analizat de asemenea specimenele din care s-a izolat Enterobacter cloacae în funcţie de secţia care a solicitat examenul microbiologic. Distribuţia confirmă datele din literatură care arată că urina este specimenul în care enterobacter este izolat cel mai frecvent. În funcţie de profilul serviciului specia bacteriană este prezentă în prelevate specifice.

Comportamentul faţă de antibiotice al tulpinilor de Enterobacter cloacae izolate şi identificate este detaliat în tabelul nr. 22, prezentat mai jos.

BUAP | CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 22. Comportamentul față de antibiotice al tulpinilor de Enterobacter cloacae

ANTIBIOTIC	1993			1996			1999		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
AMP	308	203	105	367	235	132	241	142	99
ACV	308	259	49	367	290	77	241	171	70
TIC	-	-	-	-	-	-	241	222	19
PIP	-	-	-	-	-	-	241	181	60
CFX	-	-	-	367	360	7	241	231	10
IMI	-	-	-	-	-	-	241	202	39
GEN	308	263	45	367	294	73	241	198	43
RIF	308	249	59	367	319	48	241	207	34
CLF	308	271	37	367	308	59	241	198	43
CIP	308	299	9	367	334	33	241	214	27
OFL	-	-	-	367	338	29	241	224	17
TET	308	74	234	367	76	291	241	49	192
CTX	308	209	99	367	246	121	241	171	70

După cum se poate observa din tabel, antibioticele a căror activitate asupra germenilor izolați a fost testată nu au fost întotdeauna aceleaşi; în ultimii ani au fost introduse în spital, în practica terapeutică curentă antibiotice noi, cum sunt ticarcilina, imipenemul, piperacilina.

Comportamentul tulpinilor izolate este asemănător cu al celorlalte enterobacterii analizate în lucrare, ceea ce este explicabil prin contactul germenilor din această familie cu un anume "patern" de antibiotice, utilizat mai ales în tratamentul empiric al infecțiilor urinare, digestive şi/sau pulmonare.

Antibiotice precum tetraciclina, cotrimoxazolul, amoxicilina, ampicilina şi în ultimii ani, flourochinolonele sunt extrem de utilizate, fără respectarea protocolului de diagnostic microbiologic şi de testare a comportamentului germenilor testați la antibiotice.

Antiobiotice utilizate mai ales în spital, cu preț de cost ridicat, cum sunt gentamicina, ceftriaxona sau de rezervă, cum sunt rifampicina şi cloramfenicolul au niveluri de rezistență relativ constante şi chiar mai scăzute decât la alte enterobacteriacee.

Am urmărit profilul rezistenței la antibiotice a tulpinilor de enterobacter izolate în funcție de prelevat şi de proveniența acestuia.

Am analizat în acest scop comportamentul la antibiotice a tulpinilor de Enterobacter cloacae izolate în urină, în general, fără a diferenția prelevatul în funcție de serviciul de proveniență şi am comparat rezultatele obținute cu cele obținute din analiza comportamentului tulpinilor de enterobacter izolate din specimenul puroi trimis la laborator de serviciul de traumatologie. Am ales acest prelevat deoarece, acesta reprezintă 14% din totalul prelevatelor în care s-a izolat Enterobacter cloacae. Subliniez şi ponderea mare pe care o reprezintă prelevatul secreție plagă, adică 19%. În tabelul nr. 23 sunt prezentate datele obținute.

Tabelul 23. Comportamentul față de antibiotice a tulpinilor de Enterobacter cloacae în funcție de prelevat

ANTIBIOTIC	URINA			PUROI		
	TOTAL	SENS	REZ	TOTAL	SENS	REZ
AMP	148	92	56	21	7	14
ACV	148	120	28	21	12	9
TIC	148	139	9	21	19	2
PIP	148	116	32	21	17	5

RUAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CFX	148	142	6	21	20	1
IMI	148	136	12	21	8	4
GEN	148	127	21	21	14	7
RIF	148	124	24	21	18	3
CLF	148	132	16	21	17	4
CIP	148	135	13	21	18	3
OFL	148	138	10	21	18	3
TET	148	36	112	21	2	19
CTX	148	114	34	21	11	10

Din datele prezentate se pot observa diferenţe a rezistenţei tulpinilor de enterobacter la unel antibiotice în funcţie de prelevat.

Astfel tulpinile izolate în puroi sunt mai rezistente la ampicilină comparativ cu cele izolate în urină cu 30% mai mult, diferenţă semnificativă din punct de vedere statistic (p= 0,012). Diferenţe statistic semnificative am observat şi pentru: amoxicilina + acid clavulanic (p= 0,013), gentamicina (p= 0,027) şi cotrimoxazol (p= 0,016).

O situaţie particulară observăm în comportamentul tulpinilor faţă de piperacilină. Rezistenţa tulpinilor de enterobacter izolate şi identificate în puroi este mai mică decât cea a tulpinilor din urină. Diferenţa nu are semnificaţie statistică (p=0,472).

Nu au semnificaţie statistică diferenţele observate pentru imipenem, ticarcilină, flouorochinolone.

Putem interpreta acest aspect prin utilizarea din ce în ce mai largă a fluorochinolonelor atât în ambulator cât şi în clinică.

Goldstein şi col. identifică niveluri de rezistenţă extrem de ridicate ale tulpinilor din genul Enterobacter la antibiotice, pe care le explică prin consumul exagerat şi administrarea empirică a antibioticelor mai ales în practica ambulatorie şi nu numai. Astfel ei comunică rezistenţă de până la 80% la ampicilină, la ticarcilină rezistenţa ajunge la 45% din tulpini, ceftriaxona este inactivă pe 9% din tulpini iar asocierea amoxicilină + acid clavulanic este inactivă pe 35% din tulpinile cercetate.

Într-un alt studiu, Pitout şi col. identifică niveluri de rezistenţă la antibiotice a tulpinilor microbiene din genul Enterobacter care sunt relativ apropiate de cele găsite de noi: 10% la piperacilină, 4% la aztreonam, 4% la ticarcilină, 6% la ceftriaxonă.

În Romania, Deac raportează rezistenţa la gentamicină a 15% din tulpinile izolate şi identificate în studiul său, rezistenţa la cefalotină a 4% din tulpini, iar la ampicilină 38% din tulpini. L. Grigore şi A. Poiată comunică niveluri de rezistenţă ale tulpinilor microbiene din genul Enterobacter diferite de cele identificate de noi: gentamicina este inactivă pe 30% din tulpini, ampicilina este inactivă pe 60% din tulpini. Autorii au identificat o activitate superioară compararativ cu cea raportată de noi pentru fluorochinolone.

Indiferent de valorile raportate de diverşi cercetători, trebuie avut în vedere că germenii din genul Enterobacter sunt din ce în ce mai frecvent implicaţi în etiologia infecţiilor nosocomiale. Jones identifică germenii din genul Enterobacter ca fiind a treia cauză a pneumoniilor nosocomiale, după Staphylococcus aureus şi Pseudomonas aeruginosa. De asemenea in servicile de terapie intensivă investigate de autor, bacilii din genul Enterobacter au fost pe locul al doilea, după Escherichia coli.

Aşa cum subliniază Livrelli şi col. germenii din genurile Enterobacter, Klebsiella şi Serratia sunt oportunişti importanţi, izolaţi mai ales în infecţiile tractului urinar, dar care incep să fie izolaţi din ce în ce mai mult în serviciile de terapie intensivă şi chirurgicale şi să fie implicaţi în etiologia pneumoniilor nosocomiale, a bacteriemiilor, să fie izolaţi în plagile chirurgicale suprainfectate.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

Acest fenomen sugerează o atentă monitorizare a infecțiilor cu acești germeni, însoțită de caracterizarea fenotipică și de profilul rezistenței la antibiotice.

Specia Pseudomonas aeruginosa

In intervalul de timp luat în studiu au fost izolate și identificate 971 de tulpini de Pseudomonas aeruginosa; prelevatele în care au fost izolate și identificate tulpinile de piocianic sunt prezentate în tabelul nr. 24.

Tabelul 24. Prelevatele în care a fost izolat și identificat ps. aeruginosa

PRELEVAT	1993	1996	1999	TOTAL
urina	176	215	201	592
puroi	5	9	11	25
secreție plaga	92	79	67	238
tub de dren	5	8	8	21
hemocultura	5	3	5	13
secretie vaginala	3	8	6	17
lichid pleural	7	7	10	24
alte	16	14	11	41
TOTAL	309	343	319	971

Tulpinile de piocianic izolate și identificate sunt distibuite după criteriul secției care a solicitat examenul bacteriologic.

Această distribuție reflectă distribuția tulpinilor de piocianic după prelevatul în care au fost izolate.

Astfel 34% din tulpini au fost izolate din prelevate trimise de secția de urologie, iar prelevatul urină reprezintă mai bine de 60% din totalul prelevatelor în care s-a izolat și identificat piocianic.

Tulpini de Pseudomonas aeruginosa au fost izolate în sercivii recunoscute ca fiind cu risc crescut pentru infecțiile nosocomiale, cum sunt ATI, sectorul de arși, secțiile de traumatologie și chirurgie.

Caracterizarea comportamentului piocianicului față de unele antibiotice s-a făcut , pe parcursul întregii perioade, în funcție de antimicrobienele existente la data respectivă în arsenalul terapeutic dar mai ales în funcție de antibioticele disponibile în farmacia spitalului.

În tabelul nr. 25 sunt prezentate antibioticele pentru care a fost testată sensibilitatea tulpinilor de piocianic, în funcție de an. Remarcăm ponderea mare a aminoglicozidelor în anul 1993, comparativ cu 1996 și 1999 unde ponderea aparține betalactaminelor și fluorochinolonelor.

Tabelul 25. Antibiotice testate pentru eficacitate asupra tulpinilor de piocianic

AN	ANTIBIOTICE TESTATE															
	AMP	CAB	TIC	PIP	CFU	CFT	IMI	STR	KAN	GEN	AMK	COL	NAL	CIP	OFL	CTX
1993	+	+			+	+		+	+	+		+	+			+
1996			+	+	+	+	+			+	+	+		+	+	

Legenda: Antibiotice testate în anul 1993 și în 1996 sunt marcate cu +:

Din motivul mai sus amintit prezentăm separat rezistența tulpinilor de piocianic izolate în 1993 în tabelul nr. 26.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 26. Rezistența la antibiotice a piocianIcului în anul 1993

Antibiotic testat	AMP	CAB	CFU	CFT	STR	KAN	GEN	COL	NAL	CTX
Tulpini rezistente (%)	98	76	87	4	93	97	43	38	89	94

Unele valori prezentate în grafic sunt contradictorii şi nu am găsit explicații pentru ele. Astfel la ticarcilină avem rezistență mai mică în anul 1999 comparativ cu 1996. Aceeaşi situație o întâlnim şi pentru imipenem. Ca un comentariu, fără a avea nici un suport ştiințific, decât datele raportate în literatură referitoare la activitatea acestor antibiotice asupra piocianicului, am putea explica această curiozitate prin viciu de tehnică sau de interpretare a rezultatelor.

Din punct de vedere al evoluției rezistenței piocianicului la unele antibiotice am ales două dintre cele mai folosite antibiotice în clinică şi care sunt în uzul curent în spital de mai bine de 10 ani: gentamicina şi ceftazidima.

Față de gentamicină au fost identificate următoarele rezistențe: 1993 – 43%, 1996 – 36% şi în 1999 – 41%.

Curba rezistenței piocianicului la gentamicină este aproape lineară, valorile statistice indicând un oarecare "platou".

La ceftazidimă, o cefalosporină de generația a treia, recunoscută ca având activitate pe piocianic şi care a intrat în practica curentă a spitalului din anul 1991 situația este cu totul alta. Rezistențele observate sunt: 1993 = 4%, 1996 = 8% şi 1999 = 18%. In cazul ceftazidimei rezistența piocianicului cunoaşte o tendință ascendentă.

Acest fenomen trebuie să avertizeze personalul medical că utilizarea acestui antibiotic trebuie făcută cu mult mai multă atentie, chiar cu parcimonie. Subliniem că în serviciile clinice ceftazidima este administrată şi în scop profilactic în chirurgia abdominală şi toracică.

Investigația rezistenței tulpinilor de piocianic izolate în funcție de prelevatul analizat a relevat aspecte interesante care confirmă pe deplin concluzia altor studii de profil şi care afirmă că antibioticele exercită un efect presor selectiv asupra germenilor, cu efect final apariția tulpinilor rezistente şi multirezistente.

Am luat ca referință tulpinile de Pseudomonas aeruginosa izolate în ambulatorul spitalului. Am considerat că tulpinile izolate în ambulator sunt izolate de la pacienți care nu au fost tratați încă ceea ce ne permite, cu limite şi riscuri cunoscute şi asumate în acelaşi timp, să le considerăm ca tulpini comunitare.

Am analizat tulpinile izolate în ambulator, în puroi, în secrețiii plagă şi în urină provenite din clinică de la serviciile chirurgicale şi medicale, mai puțin serviciul de urologie şi ginecologie. Rezultatele sunt trecute în tabelul nr. 27

Tabelul nr. 27. Rezistența Ps. aeruginosa la antibiotice în funcție de prelevat

ANTIBIOTIC	PUROI-%	PLAGA-%	URINA-%	R%-1999
TICARCILINA	27	8	2	4
CEFTAZIDIMA	36	22	2	18
IMIPENEM	27	9	5	6
PIPERACILINA	25	39	13	8
GENTAMICINA	45	51	2	41
AMIKACINA	38	46	23	29
CIPROFLOXACINA	45	42	8	17
OFLOXACINA	5	43	7	24

Valorile obținute arată că rezistența tulpinilor de piocianic la antibiotice este semnificativ diferită la tulpinile izolate în puroi şi în secreția plagă comparativ cu cele izolate în ambulator, valorile lui p fiind mai mici de 0,05.

După cum se poate vedea există diferențe semnificative ($p< 0,05$) între curba rezistenței tulpinilor izolate din prelevate recoltate în ambulatorul spitalului şi rezistența tulpinilor izolate peparcursul întregului an. Diferențe considerabile, care indică existența unor tulpini de spital, se remarcă şi între tulpinile izolate în urină comparativ cu cele izolate în puroi şi secreție plagă. Testele de semnificație statistică confirmă cele afirmate anterior.

Am verificat dacă diferențele observate între rezistența tulpinilor de piocianic izolate din puroi este semnificativ diferită de cea înregistrată la tulpinile izolate din secreția plagă. Testul X^2 indică lipsa semnificației statistice a diferențelor, ceea ce confirmă că tulpinile izolate în produsele biologice provenite din serviciile clinice sunt tulpini de spital, cu rezistență şi multirezistență la acțiunea antibioticelor.

Profilul rezistenței celor 5 tulpini de piocianic izolate în hemocultură nu are particularități. Tabelul nr. 28 cuprinde valorile obținute.

Tabel. 28. Comportamentul față de antibiotice a tulpinilor de Ps.aeruginosa izolate în hemoculturi

Antibiotic	Nr. Tulpini	Sensibile	Rezistente
TICARCILINA	5	5	0
CEFTAZIDIMA	5	3	2
IMIPENEM	5	5	0
PIPERACILINA	5	4	1
GENTAMICINA	5	3	2
AMIKACINA	5	4	1
CIPROFLOXACINA	5	4	1
OFLOXACINA	5	2	3

Şi în această situație, ca şi în cazul comparării "puroi versus secreție plagă" nu se observă diferențe semnificative între rezistența tulpinilor izolate în hemocultură comparativ cu cele izolate în puroi, valorile lui $p>0,05$. Această situație ne permite să considerăm că tulpinile izolate în hemoculturi sunt tot tulpini de spital, deci probabil sunt infectii nosocomiale neraportate ca atare.

Față de rezultatele obtinute se impun câteva explicații. În primul rând trebuie analizată oferta băncii de date a laboratorului. Unele antibiotice au fost testate în virtutea inerției, mai ales pentru tulpinile izolate din urină, unde s-au utilizat trusele de antibiogramă specifice. Unele antibiotice cum ar fi polimixinele, sunt testate şi rezultatele sunt excelente dar din punct de vedere clinic importanța lor este minimă. Este cazul colimicinei ale cărei proprietăți farmacocinetice nu permit utilizarea în clinică mai ales în infecții sistemice şi severe.

Tot în intervalul de timp acoperit de studiu au intrat în uzul spitalului antibiotice noi, cum ar fi imipenemul sau ticarcilina şi au fost scoase din uz unele anitibiotice a căror eficacitate este minimă sau care sunt înlocuite de antibiotice mult mai eficiente cum ar fi unele aminoglicozide (streptomicina şi kanamicina) sau carbenicilina.

Datele obținute indică o rezistență a tulpinilor izolate şi identificate de Pseudomonas aeruginosa, care se încadrează în valorile raportate atât de cercetători români cât şi străini. Diferențele care apar între diferitele studii sunt datorate în special utilizării unor metode moderne de evaluare a activității antibioticelor asupra piocianicului, cum ar E-testul, care evaluaeză şi concentrațiile minime inhibitorii, oferind informații mult mai utile şi mai exacte clinicianului decât antibiograma clasică.

Diferențele observate de noi în susceptibilitatea piocianicului la unele antibiotice sunt în corelație directă cu produsul de unde a fost izolat agentul patogen.

De asemenea trebuie să subliniem că fiecare unitate spitalicească are particularitățile ei, tulpinile microbiene având comportament diferit la antibiotice în funcție de modul de utilizare al substanțelor antimicrobiene, al utilizării unora dintre ele mai mult etc. Astfel Dinisov și col. comunică 44% din tulpini rezistente la ofloxacină, 11% rezistente la ciprofloxacină, 15% rezistente la imipenem; la gentamicină au fost rezistente 30% din tulpini iar la ceftazidimă 29% din tulpini.

Carmely și col. au evaluat riscul apariției rezistenței piocianicului la unele antibiotice β-lactamice și concluzionează că utilizarea imipenemului este insoțită de cel mai cresut risc pentru apariția rezistenței iar ceftazidima prezintă cel mai scăzut risc pentru dezvoltarea rezistenței. Aceste rezultate concordă și cu rezultatele la care a ajuns Livermore.

În concluzie putem afirma că Pseudomonas aeruginosa este un agent patogen prezent în spitalul analizat de noi. Produsele patologice recoltate de la bolnavi spitalizați trebuie investigate și pentru piocianic, iar caracterizarea fenotifică și genotipică a tulpinilor se impune pentru a se urmări circulația tulpinilor în spital.

Antibioticele cu largă utilizare în clinică, cum sunt gentamicina, ceftazidima, ciprofloxacina tind să-și piardă din eficacitatea inițială.

Clinicienii trebuie să colaboreze cu microbiologul spitalului pentru a se realiza un sistem de supraveghere activă a tulpinilor de piocianic circulante în spital.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 8

CONTROLUL STĂRII IGIENICO-SANITARE ÎN SPITAL

În cursul acestei perioade am evaluat si starea igienico-sanitară din spital şi în mod special în blocurile operatorii.

Încărcătura bacteriană în sectoarele clinice cu risc crescut de transmitere a infecţiilor nosocomiale

Au fost recoltate 1006 probe de laborator, distribuite pe categorii de investigaţii, astfel:

- teste pentru încărcarea microbiană a suprafeţelor "teste igienico-sanitare" (TIS);
- teste pentru încărcarea microbiană a aerului din sălile de operaţie, pansamente, saloane ATI,"aeromicroflora" (AMF);
- teste pentru verificarea presterilizării instrumentarullui, "Adler";
- teste pentru verificarea sterilizării instrumentarului şi a materialului moale,"sterilităţi".

În tabelul nr. 29 sunt înregistrate numeric testele efectuate pentru evaluarea eficienţei acţiunilor de curăţenie şi dezinfecţie.

Tabel nr. 29. Cantitatea de analize de microbiologie sanitara prelucrate

Data	TIS	AMF	Sterilitate	Adler	TOTAL
Aprilie	50	19	29	14	112
Iunie	157	82	194	96	529
August	58	23	38	28	147
Octombrie	84	48	116	54	302
TOTAL	349	172	377	192	1090

Teste igienico-sanitare în blocurile operatorii şi sălile de pansament

Din cele 347 de tampoane igienico-sanitare (TIS) recoltate, 281 au fost corespunzătoare adică 80,9%, iar 66 de probe au avut o încărcătura microbiană peste normele admise.

Din cele 66 de probe necorespunzătoare din punct de vedere al numărului de colonii pe unitatea de suprafaţă, în 8 probe a fost identificat stafilococ auriu.

Încărcătura bacteriană a aerului din blocurile operatorii, săli de pansamente şi saloane postoperator

Au fost recoltate 172 de probe de aeromicrofloră (AMF), din care 88 s-au încadrat în limitele admise pentru sectorul în care s-a efectuat testarea.

Celelalte 84 de probe au avut o încărcătură microbiană, floră mezofilă, peste limitele admise pentru sectorul investigat.

De remarcat că în sălile de operaţie, dotate cu aparate de are condiţionat, încărcătura microbiană a fost în proporţie de 96% sub limitele admise (2 probe pozitive, una în luna iunie şi alta în luna august).

Se remarcă procentul excesiv de crescut al probelor necorespunzătoare. Se poate observa că în lunile de primăvară şi toamnă gradul de prăfuire este un pic mai redus decât în lunile de vară când aerisirea încăperilor se face prin deschiderea ferestrelor.

O explicaţie pentru nivelul extrem de ridicat de prăfuire şi implicit a contaminării bacteriene este executarea unor lucrări de reparaţii şi modernizare în vecinătatea spitalului şi a unor lucrări de reparaţii la reţeaua de apă şi canalizare din spital în decursul anului 1999. Am remarcat traficul intens cu autocamioane şi basculante în spital şi în vecinătatea acestuia.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Controlul presterilizării instrumentarului

Se efectuează pentru identificarea prezenței urmelor de sânge pe instrumentarul chirurgical pregătit pentru a fi sterilizat. Din cele 192 de teste efectuate au fost identificate ca necorespunzătoare 3 probe, ceea ce corespunde unui procent de 2% din total. Au fost gasite necorespunzătoare două pense Pean şi o foarfecă. Acest tip de instrumentar este cel mai frecvent identificat ca necorespunzător datorită caracteristicilor constructive.Dacă imbinarea intrumentului este fixă, nedemontabilă, îndepărtarea murdăriei şi a urmelor de sânge se face cu dificultate.

Controlul sterilizării

Au fost efectuate 377 de teste pentru verificarea eficienței sterilizării în spital. Dintre acestea 17 probe au fost pozitive, adică 4,5%.

Un aspect particular este acela al distribuției pe instrumentar şi materiale a "nesterilelor". Din cele 17 "nesterile" 10 sunt reprezentate de ața chirurgicală. Ața chirurgicală se sterilizează prin autoclavare şi prin oxid de etilenă. Au fost găsite bobine de ață nesterile prelucrate prin ambele metode de sterilizare. Se remarcă ponderea "nesterilelor" care pot contribui la apariția infecției plagii chirurgicale şi care reprezintă 70% din total. Acest procent va avea corespondentul în proporția infecțiilor la nivelul suturii plăgii chirurgicale.

Testele pentru sterilitatea apei au fost corespunzătoare, nu a fost identificată nici o probă nesterilă.

Starea igienico sanitară în oficiile alimentare şi blocul alimentar

Au fost efectuate 638 de teste igienico-sanitare pentru controlul stării igienico-sanitare la oficiile alimentare din secții şi la blocul alimentar. Dintre acestea 592 s-au încadrat în normele admise ca încărcătură microbiană, adică 92,7%.

Nu au fost identificați germeni coliformi în probele recoltate ceea ce indică absența poluării fecale în spațiile investigate.

Două aspecte trebuie menționate aici: in depozitul de legume şi zarzavaturi am identificat un grad ridicat de contaminare cu fungi, mai ales cu *Aspergillus spp* şi în unele oficii alimentare, gradul de clătire al veselei şi tacâmurilor lasă de dorit, acestea prezentând urme de detergenți.

Controlul stării de igienă şi portajul de germeni patogeni la personalul spitalului

Portajul de germeni patogeni Au fost recoltate 37 tampoane nazale de la personalul din blocurile operatorii, medici şi asistente medicale.

Dintre acestea, 16 au fost pozitive, izolându-se şi identificându-se Staphylococcus aureus, adică 43,2% .

Controlul igienei mâinilor personalului

Au fost testați 38 de medici şi asistenete medicale pentru identificarea numărului de germeni (unități formatoare de colonii UFC) la nivelul mâinilor în timpul executării diferitelor manevre şi gesturi medicale.

Probele au fost recoltate de pe fața palmară a mâinii prin ştergerea unei suprafețe de 5/5 cm.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul nr. 30.

Tabelul 30. Încărcătura microbiană a mâinilor personalului medical

	ÎNCĂRCĂTURA MICROBIANA (UFC/dm^2)		
	0 – 100	101-300	PESTE 300
Nr.probe	7	19	12

Flora izolată şi identificată: stafilococi coagulazo-negativi: 6 probe; stafilococ auriu – 2 probe; streptococ – 1 probă, colibacili – 3 probe; proteus – 1 probă.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În general testele efectuate în spital indică o stare igienică corespunzătoare. Cu toate acestea existența unor condiții favorizante apariției infecțiilor nosocomiale nu poate fi negată.

Prezența oricărui microorganism patogen sau potențial patogen pentru om în sățile de operație, în spațiile de spitalizare şi de acordare a îngrijirilor medicale reprezintă un factor de risc asupra căruia nu mai este nevoie să insistăm.

Un studiu efectuat de Pittet şi col. subliniază rolul important al spălării mâinilor înainte şi după fiecare gest medical. Autorii subliniază că simpla spălare cu săpun reduce cu peste 80% încărcătura microbiană a mâinii iar utilizarea unui antiseptic pentru mâinii previne contamiinarea mâinii pentru 15 – 30 minute, numărul de unități formatoare de colonii fiind pe parcursul acestui interval sub 20 UFC/dm^2. Importanța igienei mâinii este subliniată şi de Larson.

Intr-un alt studiu este subliniată importanța purtarii corecte a măştii individuale, pentru reducerea transmiterii pe cale aeriană a unui mare număr de germeni, mai ales a virusurilor respiratorii, a respectării regulilor de igienă personală şi colectivă care includ igiena mâinii, portul echipamentului, portul mănuşilor chirurgicale pentru executarea unor manevre medicale etc.

Reducerea portajului de germeni este considerată ca o măsură extrem de importantă în reducerea infecțiilor nosocomiale şi mai ales a celor datorate intervențiilor chirurgicale.

Starea de curățenie şi utilizarea corectă a mijloacelor de dezinfecție în spitale se repercută direct asupra incidenței infecțiilor nosocomiale. Măsurile luate pentru controlul circulației germenilor într-un spital au dus la scăderea incidenței infecțiilor nosocomiale între 20 - 45% în diferitele secții clinice. Controlul eficienței măsurilor de dezinfecție, a sterilizării şi a igienei mâinii au fost dintre măsurile luate, pe lângă controlul antibioterapiei şi mai ales a profilaxiei cu antiibiotice.

Intr-un studiu complex al factorilor care contribuie la creşterea prevalenței infecțiilor nosocomiale, Wong identifică gradul de contaminare microbiană a mediului spitalicesc ca fiind unul dintre factorii de risc esențiali, alături de durata spitalizării, pentru dobândirea unei infecții nosocomiale. Autorul stabileşte un raport direct proporțional între expunerea la mediul spitalicesc contaminat microbian, durata spitalizării, manevrele chirurgicale suportate de pacient şi prevalența infecțiilor nosocomiale într-un spital.

În concluzie, datele obținute din analiza încărcăturii microbiene din spital ne permit să afirmăm că pacienții sunt expuşi unui real risc de contaminare bacteriană, ceea ce impune executarea mult mai riguroasă a activităților de curățenie, dezinfecție, sterilizare, de respectare a regulilor de igienă personală şi colectivă.

IDENTIFICAREA INFECȚIILOR NOSOCOMIALE

Pentru a identifica infecțiile nosocomiale am apelat la specimenele trimise spre analiză laboratorului de microbiologie într-o singură zi, aleasă într-un mod aleator. Datele obținute sunt prezentate în tabelul nr. 31.

Tabel nr. 31. Infectii nosocomiale suspectate, conform studiului statistic

Nr. crt.	Sectia	Diagnosticul	Germen
1	Traumatologie	Secreție plagă gamba stângă	Staf. auriu
2	Chirurgie	Secretie plaga chirurgicală	Staf. epid
3	Chirurgie (proba a II-a)	Secreție plagă cervicală	Staf. epid
4	Chirurgie toracica	Secreție plagă operată torace anterior parasternal	Piocianic + E.coli
5	Traumatologie	Secreție plagă planta dreaptă	Staf.epid
6	Traumatologie	Puroi plagă post traumatică antebrat	Staf. auriu

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

	(proba a II-a)	drept	
7	Chirurgie	Plagă operată supurată	Hafnia sp.
8	Oftalmologie	Secreție plagă ochi stâng	Staf. epid
9	Interne	Secreție ulcer varicos	Piocianic
10	Chirurgie toracica	Secreție tub dren	Staf. epid
11	Chirurgie	Panariţiu inelar stâng	Staf.auriu
12	Traumatologie	Secreție plagă gamba dreaptă	Staf. auriu
13	Traumatologie	Fistulă umăr stâng	S. auriu
14	Traumatologie	Secreție fistulă sternală post traumatism toracic	S. auriu
15	Traumatologie (proba a III-a)	Spută purulentă (la pacient politraumatizat- 28 zile spital)	Staf.auriu
16	Traumatologie	Plagă mâna dreaptă	Staf. epid
17	Oftalmologie	Implant cristalin OD (la 48 zile)	Staf.auriu
18	Chirurgie toracica	Secreție dren colector retrosternal	Staf.epid
19	ORL	Secreție nazală postoperator sinus	Staf.auriu
20	Traumatologie	Secreție purulentă deget inelar stâng	Staf.auriu
21	Traumatologie	Fractura gamba dreaptă -fistula proximala +distala	Staf.auriu
22	Urologie	Secreție fistula	E.coli
23	Chirurgie	Secreție fistulă ombilicală	Klebsiella pn.

Se poate observa corespondența dintre ponderea specimenelor trimise de Traumatologie şi celelalte servicii cu ponderea izolatelor provenite de la Traumatologie, prezentată în capitolele referitoare la analiza germenilor izolați, ceea ce este un indicator al numărului de infecții care evoluează în sectorul discutat. Am prezentat ponderea speciilor izolate în laboratorul de microbiologie în "ancheta de o zi", pentru a afla care sunt germenii cel mai frecvent izolați în suspiciunea de infecție nosocomială. Se remarcă ponderea stafilococilor, care reprezintă peste 70% din totalul speciilor izolate. Acest aspect concordă cu constatarea făcută anterior şi anume că stafilococii sunt cel mai frecvent izolați în secrețiile plagă. Pentru a identifica infecțiile nosocomiale de la nivelul serviciului de traumatologie din suspiciunile existente, am extras din tabel specimenele provenite de la Traumatologie, tabelul nr.32

Tabel 32. Specimene trimise la laborator de microbiologie de sectia Traumatologie

Nr. crt.	Sectia	Diagnosticul	Germen	Obs.
1	Traumatologie	Secreție plagă gambă stângă	Staf. auriu	1¤
2	Traumatologie	Secretie plagă planta dreaptă	Staf.epid	5
3	Traumatologie* (proba a II-a)	Puroi plagă posttraumatică antebraț drept	Staf. auriu	6
4	Traumatologie*	Secreție plagă gamba dreaptă	Staf. auriu	12
5	Traumatologie	Fistula umăr stâng	S. auriu	13
6	Traumatologie*	Secreție fistulă sternală, posttraumatism toracic	S. auriu	14
7	Traumatologie	Secreție purulentă deget inelar stâng	Staf.auriu	20
8	Traumatologie*	Fractură gamba dreaptă -fistulă proximală +distală	Staf.auriu	21

BCU "I.C. BRĂTIANU" UNIVERSITY LIBRARY

9	Traumatologie* (proba a III-a)	Spută purulentă (la pacient politraumatizat- 28 zile spital)	Staf.auriu	15
10	Traumatologie	Plagă mâna dreaptă	Staf. epid	16

* infecţii nosocomiale depistate; corespondenţa cu tabelul anterior.

Pentru a identifica infecţiile nosocomiale am apelat la studiul foii de observaţie, din care am extras următoarele informaţii:

-diagnosticul de internare;

-durata spitalizării;

-dacă pacientul a suferit intervenţii chirurgicale;

Am obţinut următoarele informaţii (cu respectarea identitatii pacientilor):

- pacienţii 1, 2, 10: au fost internaţi cu diagnostic de plagă infectată, între 24 – 72 ore de la internare;
- pacienţii 3 şi 4: au beneficiat de tratament chirurgical; nu se specifică diagnostic de plagă infectată la internare; între 48 – 120 ore de la internare;
- pacientul 5: infecţie la nivelul scapulohumerale după infiltraţii cu novocaină, administrate posttraumatism în afara spitalului (prima administrare în urmă cu 96 de ore faţă de momentul internării);
- pacienţii 6, 8: peste 7 zile de internare, fără diagnostic de infecţie la internare; au beneficiat de tratament chirurgical, specific tupului de fractură;
- pacientul 7: diagnostic la internare: osteită falanga distală inelar stâng post plagă tăiată;
- pacientul 9: politraumatizat în accident rutier, cu fractură de bazin, imobilizat de 28 de zile, suspect de pneumonie.

Datele mai sus prezentate permit următoarele concluzii:

- pacienţii 3, 4, 6 şi 8: infecţii nosocomiale la nivelul plăgii chirurgicale;
- pacientul 5: infecţie iatrogenă, dobândită în afara spitalului;
- pacientul 9: pneumonie nosocomială, la pacient imobilizat la pat de 28 zile.

Rezultă că au fost identificate 5 infecţii nosocomiale certe, care reprezintă 6,02 % din cei 83 de pacienţi internaţii în secţia de traumatologie în ziua respectivă. Cele 5 infecţii nosocomiale au ca agent etiologic *Staphylococcus aureus*.

După cum se poate observa comportamentul faţă de antibiotice al tulpinilor de stafilococ auriu este diferit faţă de celelalte tulpini de stafilococ izolate în aceeaşi zi, mai ales faţă de β-lactamine; se compară rezistenţa observată cu rezistenţa globală a stafilococilor. Numărul mic de tulpini izolate nu ne permite să facem comparaţii pertinente cu alte studii din literatură dar, valorile raportate sugerează existenţa tulpinilor înalt rezistente la antibiotice, aspect caracteristic tulpinilor de spital.

Secţia de Chirurgie generală a trimis în aceeaşi zi la laboratorul de microbiologie, 5 specimene, dintre care unul este recoltat de la un pacient cu o infecţie preexistentă (proba 3 din tabelul In-1). Proba 11 (panariţiu inelar stâng) a fost recoltată de la un pacient prezentat în serviciul de gardă din seara precedentă şi care nu a fost internat.

Celelalte 3 prelevate (probele 2, 7 şi 23) sunt recoltate de la pacienţi care prezintă următoarele particularităţi:

- pacientul 2: internat pentru lipom laterocervical stâng, operat cu 72 de ore înainte de recoltarea specimenului;
- pacientul 7: plagă chirurgicală superficială supurată postapendicectomie, la pacient operat cu 6 zile în urmă, fără tratament antibiotic;
- pacientul 23: secreţie fistulă paraombilicală, la pacient operat pentru cancer de cec în urmă cu 11 zile; tratament antibiotic cu oxacilină + gentamicină + metronidazol. Antibiograma efectuată indică rezistenţa tulpinii de stafilococ izolată şi identificată la:

BCU IASI FARMACIE UNIVERSITY LIBRARY

oxacilină, gentamicină, ceftazidimă, cefuroximă. Tulpina era sensibilă la: cefoperazonă, vancomicină, cloramfenicol, rifampicină şi ciprofloxacină.

Putem afirma că toţi pacienţii selecţionaţi din secţia chirurgie prezintă o infecţie nosocomială.

În concluzie identificarea infecţiilor nosocomiale este posibilă şi prin metoda anchetei epidemiologice, pornind de la datele furnizate de laboratorul de microbiologie.

După prelucrarea datelor culese, se pot selecţiona "suspiciunile de infecţie nosocomială".investigaţia poate fi continuată în secţia clinică cu acceptul şi colaborarea medicilor clinicieni.

Comentariu Impactul infecţiilor nosocomiale asupra pacientului, presiunea pe care o exercită asupra personalului medical şi influenţa lor în costurile medicale sunt elemente care nu pot fi neglijate în nici un fel, dacă se doreşte îmbunătăţirea calităţii actului medical şi scăderea reală a cheltuielilor.

Fenomenul care este cel mai des citat în literatură şi care influenţează în mod direct starea pacientului este rezistenţa microbiană la antibiotice. Nu de puţine ori în infecţii localizate sau sistemice are loc o "luptă" oarbă între medic şi microorganismul patogen care posedă rezistenţă sau multirezistenţă la antibioticele cu care este "bombardat" de către medic.

Ignorarea etapelor diagnostice, a unor principii terapeutice şi profilactice, duce la administrarea empirică şi chiar haotică a antibioticelor, urmată în mod firesc de eşecul terapeutic. Eşecul terapeutic se datorează de cele mai multe ori necunoaşterii sensibilităţii la antimicrobiene a agentului microbian incriminat.

O altă cauză de eşec este aceea a deficienţelor de diagnostic microbiologic. Utilizarea unor metode diferite, chiar determinată de situaţii obiective cum ar fi dificultăţile de aprovizionare cu materiale şi reactivi, poate duce la rezultate care să nu poată fi utilizate integral de clinician. Efectuarea antibiogramei cu discuri sau microcomprimate nestandardizate sau cu concentraţii diferite de antibiotic oferă doar rezultate aproximative. Într-un fel interpretezi o inhibare de 3 mm a dezvoltării unei unei tulpini în jurul unui disc cu 10 μg şi într-altfel dacă discul conţine 25 μg antibiotic. Dacă aceste variaţii nu sunt corect interpretate apar confuzii şi chiar erori care influenţează în mod direct şi brutal soarta pacientului şi nu numai.

Profilul de rezistenţă la antibiotice a diferitelor tulpini şi specii bacteriene circulante în spital este un important instrument de lucru pentru clinicieni. El ajută la alegerea cât mai aproape de "realitate" a terapiei antibacteriană de primă intenţie, pe baza datelor statistice furnizate. Acest fapt ar duce la diminuarea perioadei de tratament, de spitalizare, la reducerea cheltuielilor şi la reducerea riscului de apariţie a rezistenţei microbiene.

De asemenea utilizarea unor metode de laborator pentru conducerea şi evaluarea tratamentului antimicrobian îşi găseşte utilitatea atunci când obţinerea unor niveluri sanguine eficiente de antibiotic este necesară, cum este cazul în tratamentul infecţiilor sistemice,al endocarditelor, al osteomielitelor.

Alegerea antibioticului în funcţie de CMI sau CMB, administrarea lui în funcţie de proprietăţile lui farmacodinamice, cunoaşterea nivelului sanguin bactericid sau inhibitor, se constituie în componentele unui tratament antimicrobian bazat pe date ştiinţifice, cu şanse de reuşită.

O problemă extrem de importantă este aceea a cunoaşterii tulpinilor microbiene care circulă în spital. Cunoaşterea fenotipului sau lizotipului tulpinilor izolate şi identificate permite identificarea traseelor prin care aceste tulpini difuzează de la un pacient la altul, a căilor prin care germenii sunt transferaţi dintr-un sercivu într-altul. Aparent fără importanţă pentru medicul clinician, aceste informaţii permit supravegherea circulaţiei unei anumite tulpini, permit identificarea surselor de infecţie şi/sau a rezervorului de germeni, cum ar fi de exemplu purtătorii de stafilococ aurie sau epidermidis din rândul personalului blocului operator sau purtătorii de salmonele sau shigele dîn rândul personalului de auxiliar

BUASVM CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Din păcate la nivelul spitalului analizat există multe condiții favorizante ale apariției fenomenului de rezistență bacteriană la antibiotice. Condițiile favorizante sunt datorate clinicilor sau laboratorului.

Condiții favorizate de clinică:

- diagnosticul de infecție este aproape întotdeauna urmat de administrarea de antibiotice, indiferent de starea clinică a pacientului;
- recoltarea de prelevate pentru examenul microbiologic este de cele mai multe ori amânată sau chiar compromisă din cauza administrării antibioticelor;
- administrarea profilactică a antibioticelor preoperator

Condiții favorizate de laborator:

- efectuarea antibiogramelor nu este întotdeauna conformă cu metodele standardizate, utilizarea de discuri cu concentrații diferite de antibiotic;
- nu se face identificarea fonotipică, lizotipică etc. a tulpinilor izolate;
- nu se execută controlul intern de calitate, pe tulpini standard;
- nu se execută controlul extern de calitate.

Condițiilor favorizante apariției și dezvoltării unor tulpini microbiene rezistente și multirezistente la antibiotice li se agaugă lipsa aproape în totalitate a preocupărilor legate de identificarea, supravegherea și controlul infecțiilor nosocomiale.

Privite ca o activitate neesențială, atribut doar al epidemiologilor, supavegherea și controlul infecțiilor nosocomiale este îngreunată de ignorarea sau câteodată chiar de opoziția clinicianului la efectuarea unor investigații menite să evalueze impactul acestor infecții asupra pacienților, actului medical, costurilor etc.

Realizarea "anchetei de o zi" a fost urmată de discuții la nivelul secțiilor implicate din care au rezultat următoarele concluzii:

- diagnosticul de infecție la internare este extrem de important, el infuențând considerabil investigațiile și tratamentul pacientului;
- investigația microbiologică este singura metodă care permite cunoașterea agentului patogen și susceptibilitatea acestuia la antibiotice;
- colaborarea directă cu laboratorul de microbiologie atunci când situația o impune (ineficiența tratamentului, suspiciunea existenței mai multor germeni, particularizarea tratamentului etc.);
- apariția în timpul spitalizării a unor infecții, supurații, secreții etc. trebuie interpretată ca o infecție nosocomială;
- investigația și tratamentul infecției nosocomiale se face prin consult interdisciplinar, cu participarea laboratorului și a epidemiologului spitalului.

Toate aceste considerații sunt fără nici o valoare dacă nu sunt urmate de elaborarea unui **plan de acțiune** menit să reducă incidența și prevalența infecțiilor nosocomiale în spital.

În acest sens am considerat oportună realizarea, impreună cu medicii clinicieni dintr-un serviciu clinic a unui plan de acțiune, care să permită evaluarea situației în spital și în același timp să fie un instrument de lucru pentru toți cei implicați în supavegherea, prevenirea și controlul infecțiilor nosocomiale în spital

Acest plan are la bază anexa 4 a Ordinului Ministrului Sănătății nr. 984/1994, care se referă strict la supravegherea epidemiologică a infecțiilor nosocomiale precum și ghidurile elaborate de specialiști din țară și din străinătate.

Adițional planului am considerat util să realizam si un instrument de lucru care să permită crearea unei bănci de date și prelucrarea statistică a acestora pentru evaluarea în orice moment a situației din spital, astfel incat planul de actiune pentru reducerea infectiilor nosocomiale sa fie implementat cu eficienta maxima.

In argumentarea planului de acțiune am pornit de la datele pe care le oferă literatura de specialitate dar și de la datele obținute în urma anchetei epidemiologice efectuate în spital.

BCU "CAROL I" TRANSILVANIA UNIVERSITY LIBRARY

Am considerat important să subliniem relația directă dintre existența germenilor rezistenți la antibiotice şi prezența şi evoluția infecțiilor nosocomiale într-un spital.

Am subliniat de asemenea că nu măsurile restrictive adresate consumului de antibiotice duc la rezolvarea problemei, ci numai instituirea unei strategii terapeutice, bazată pe argumente microbiologice şi clinice poate diminua amplitudinea fenomenului. Rezulta necesitatea elaborarii unor Protocoale terapeutice antiinfectioase, de antibioterapie si tratamente adjuvante, care sa optimizeze terapia antiinfectioasa la nivelul medicinei primare si de specialitate.

În realizarea planului am pornit de la realitățile secției clinice, lăsând medicii clinicieni să elaboreze principalele măsuri. Planul are următoarea structură:

-măsuri organizatorice:

-circuitele în secție;

-starea igienico-sanitară;

-portajul de germeni.

-măsuri adresate pacientului:

-diagnosticul de infecție la internare;

-investigarea microbiologică preoperator, dacă este cazul;

-limitarea profilaxiei pre-, intra- şi post operatorie cu antibiotice.

-diagnosticul şi tratamentul infecției nosocomiale:

-investigarea clinică şi microbiologică a oricărei suspiciuni de infecție nosocomială, conform definițiilor din anexa 1 a Ordinului M.S. nr.984/1994;

-specificarea suspiciunii de infecție nosocomială în datele paşaportale care însoțesc prelevatele la laboratorul de micropbiologie;

-investigații microbiologice detaliate, cu caracterizarea fenotipică, lizotipică etc. a tulpinilor;

-instituirea tratamentului în funcție de rezultatele antibiogramei;

-informarea epidemiologului spitalului, pentru realizarea anchetei epidemiologice şi instituirea măsurilor specifice.

Eficiența unui asemenea plan poate fi apreciată numai după ce sistemul este deplin funcțional şi cel mai important este acceptat de toți cei implicați. Datele din literatură estimează că rezultatele implementării unui sistem de control şi supraveghere în infecțiile nosocomiale se pot evalua după cel puțin 18 luni.

Indiferent de modalitatea aleasă pentru supravegherea şi controlul infecțiilor nosocomiale, rezultatele sunt importante şi trebuie să constituie argumentele şi punctul de plecare în profilaxia infecțiilor nosocomiale.

COMENTARIU

Parcurgând etapele anchetei epidemiologice asupra fenomenului rezistenței bacteriene la antibiotice şi a identificării infecțiilor nosocomiale în spitalul luat în studiu am ajuns la mai multe concluzii cu aplicabilitate practica pentru personalul medico-farmaceutic.

Concluzii referitoare la studiul rezistenței microbiene la antibiotice:

-la nivelul spitalului recoltarea şi transportul prelevatelor către laboratorul de microbiologie se face corespunzător, fără a exista condiții de contaminare a mediului sau personalului şi de contaminare externă a prelevatelor;

-prelucrarea prelevatelor se face uneori cu întârziere, ceea ce poate duce la alterarea lor şi modificarea rezultatelor;

-nu se practică, cu foarte rare excepții examenul microbiologic direct;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

-antibiogramele sunt efectuate în funcţie de materialele existente în laborator, ceea ce duce de multe ori la rezultate ce nu pot fi comparate între ele;

-nu se execută controlul intern de calitate a rezultatelor prin testarea discurilor pentru antibiograme pe tulpini standard;

-nu se execută caracterizarea fenotipică, lizotipică a tulpinilor izolate şi identificate;

Concluzii referitoare la supravegherea, profilaxia şi controlul infecţiilor nosocomiale:

-la nivelul spitalului activitatea de supraveghere, prevenire şi control a infecţiilor nosocomiale se execută sporadic;

-nu există un sistem de raportare a infecţiilor nosocomiale;

-la nivelul secţiilor clinice antibioticoterapia se practică de cele mai multe ori fără recoltarea prealabilă de prelevate pentru examenul microbiologic;

-profilaxia cu antibiotice este o obişnuinţă a medicilor, de cele mai multe ori nejustificată de condiţii obiective;

-consultul interdisciplinar pentru diagnosticul şi tratamentul infecţiilor severe se practică numai în situaţii excepţionale.

Concluzii asupra modului în care am desfăşurat ancheta epidemiologică:

-nu am reuşit să angajam suficient în această anchetă medicii curanţi şi consideram acest fapt ca un neajuns al studiului, influenţat de mentalitatea celor apelaţi;

-nu am reusit sa accesam in amanunt banca de date a farmaciei spitalului pentru a analiza consumul specific de antibiotice;

-foile de observaţie din arhiva spitalului au putut fi consultate numai sporadic;

-studiul de farmacoeconomie nu a putut sa fie finalizat in aceasta etapa.

Ca o concluzie generala, la nivelul spitalelor se manifestă fenomenul rezistenţei bacteriene la antibiotice iar infecţiile nosocomiale sunt prezente dar, deşi sunt recunoscute teoretic, în practică sunt ignorate, motiv pentru care nu se poate evalua cu certitudine adevarata lor amploare. Este necesar ca studiul infectiilor nosocomiale sa continue, in paralel cu studiul rezistentei microbiene fata de medicamentele antimicrobiene si al igienei spitalicesti, impreuna cu toti colegii interesati din toate unitatile sanitare din Romania.

BIBLIOGRAFIE

Achenbach L. 1992. Bacterial and Viral Genetics in Microbiology 460, Southern Illinois University, Department of Microbiology, http:// www.science.siu.edu /microbiology/micr460.

Alexander J.W. 1970. Pseudomonas infections in man. Proceedings of the International Conference on Nosocomial Infection. C.D.C. p. 103-109.

Alexandrescu L., Negruţiu L., Curescu M., Marincu I., Laitin S. 2000. Fluorochinolonele în tratamentul pneumoniilor bacteriene. Al VIII-lea Congres Naţional de Boli Infecţioase , mai 2000, caiet de rezumate, p.226.

Andersen B.M.1998. Economic Consequences of Hospital infection in a 1,000-Bed Universitary Hospital in Norway. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 19:805-807.

Anderson R.L., Carr J.H., Bond W.W., Favero M.S. 1997. Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. Infect. Control Hosp.. Epidemiol.; 18: 195-199 [MEDLINE].

Angelescu M. 1998; Terapia cu antibiotice, Ed.Medicală, Bucureşti.

Astagneau P. 1996. La lutte contre les infections nosocomiales en France. http://www.ccr.jussieu.fr/cclin/infectnoso.html.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Astagneau P., Fleury L., Leroy S., Lucet J.C., Golliot F., Regnier B., Brucker G. 1999. Cost of antimicrobial treatment for nosocomial infections based on a French prevalence survey. J. Hosp. Infect. 42(4): 303-312.
Balş M. 1982; Infecțiile în terapia intensivă, Ed. Medicală, Bucureşti.
Barry A.L., Brown D.S., Novick W.J. 1995. In Vitro Activities of Cefotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime, Cefpirome, and Penicillin against Streptococcus pneumoniae Isolates. Antimicrob.Agents Chemother. 39(10):2193-2196.
Belongia E.A., Schwartz B. 1998. Strategies for promoting judicious use of antibiotics by doctors and patients. BMJ 317: 668-671.
Berbecar S., Rafila A., Banta S. 1999. Studii cu privire la sensibilitatea la antibiotice a bacilului piocianic, izolat din diverse produse patologice. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti, caiet de rezumate, p. 70.
Bert. F., Maubec E., Bruneau B., Berry P., Lambert-Zechovsky N. 1998. Multi-resistant Pseudomonas aeruginosa outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. J. Hosp. Infect. 39(1): 53-62 [Abstract, MEDLINE].
Bhorade S.M., Christenson J., Pohlman A.S., Arnow P.M., Hall J.B. 1999. The incidence of and clinical variables associated with vancomycin-resistant enterococcal colonization in mechanically ventilated patients.Chest 115(4): 1085-1091.
Bloom B.R., Murray C.J.L. 1992. Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer, Science, 257:1055.[MEDLINE]
Bloomfield S.F., Uso E.E. 1986. The antibacterial properties of sodium hypoclorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. J. Hosp. Infect. 6: 20-30 [MEDLINE].
Bolyard M.L., Tablan O.C., Williams W.W., Pearson L.M.,Shapiro C.N., Deitchman S.D. 1998. Guideline for infection control in health care personnel. Am. J. Infect. Control, 26(3): 289-355.
Bonhoeffer S., Lipsitch M., Levin B.R. 1997. Evaluating treatment protocols to prevent antibiotic resistance. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 94:12106-12111.
Botea S., Andrei M., Iancuț L., Kiliment I. 1999. Agenți etiologici izolați în plăgi cutanate. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti, volum rezumate, p. 68.
Bouru P. 1989. Les infections nosocomiales. Nouv. Press Med. 31:1436.
Brachman P.S. 1993. Nosocomial Infections Surveillance. Infect. Control and Hosp Epidemiol. 14: 194-196 .
Brachmann P.S. 1981. Nosocomial Infection control: an overview. Rev. Infect. Dis. 3(4):640-648.[MEDLINE]
Bradley C.R., Fraise A.P. 1996. Heat and chemical resistant of enterococci. J. Hosp. Infect. 34:191- 196 [MEDLINE].
Bradley D.R., Babb Jr., Ayliffe G.A.J. 1995. Evaluation of the Steris System 1 peracetic endoscope processor. J. Hosp. Infect. 25:143-51 [MEDLINE].
Bradley J.S., Connor J.D. 1991. Ceftriaxone failure in meningitis caused by Streptococcus pneumoniae with reduced susceptibility to beta-lactam antibiotics. Pediatr.Infect. Dis. J, 10 :871.
Brown E.H., Spencer R.C., Brown J.M.C. 1990.The emergence of bacterial resistance in hospitals-a need for continuous surveillance. J. Hosp. Infect. 15 Suppl.A: 35-39.
Buiuc D. 1998. Microbiologie clinică, Ed. Didactica si Pedagogică, Bucureşti.
Burket J.S. Barlett R.H., Vanderhyde K., Chenoweth C.E. 1999. Nosocomial Infections in adult patients undergoing extracorporeal membrane oxygenation. Clin. Infect. Dis. 28(4): 828-833 [Abstract. MEDLINE].
Bush K., Macielag M. 2000. New approaches in the treatment of bacterial infections. Current Opinion in Chemical Biology 4: 433-439.
Bush K, Miller G.H. 1998. Bacterial enzymatic resistance: β-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes., Current Opinion in Microbiology 1998, 1: 509-515.
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Calomfirescu A., Cupcea M., Tisu A. 1986. Ghid metodologic de expertizare a condiţiilor igienico-sanitare din unităţile sanitare cu paturi. Institutul de Igienă şi Sănătate Publică, Caiet metodologic nr. 2, p.6-50.
Callis C.M., Hall R.M. 1995. Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons. Antimicrob. Agents Chemother. 39(1):155-162
Cardo D. M., Soule B.M. 1999. Hospital infection prevention and control: A global perspective. Am.J. Infect. Control 27(3):1.
Cardoso C.L., Pereira H.H., Zequim J.C., Guilhermetti M. 1999. Effectiveness of hand-cleansing agents for removing Acinetobacter baumannii strain from contaminated hands. Am. J. Infect. Control. 27(4): 327-331.
Carmeli Y. Troillet N., Eliopoulos G.M., Samore M.H. 1999. Emergence of Antibiotic-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents. Antimicrob.Agents Chemother. 43(6): 1379-1382.
Cauet D., Quenon J.L., Desve G. 1998. Un outil pour l' informatisation des enquetes de prevalence des infections nosocomiales. Hygienes VI(1):47-50 [Abstract. MEDLINE].
Cauet D., Quenon J.L., Desve G. 1999. Surveillance of hospital infections: presentation of a computerised system. Eur. J. Epidemiol. 15: 149-153.
Centers for Disease Control. 1987.Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. MMWR 36(2S):1S-18S.
Centers for Disease Control. 1992. Public health focus: surveillance, prevention and control of nosocomial infections. MMWR, 41:783-787.
Centers for Disease Control. Antibiotic Resistance, www.cdc.gov/ncidod/dbmd/ antibioticresistance.
Centers for Diseases Control. 2000. Monitoring Hospital Acquired Infection to Promote Patient Safety – United States 1990-1999. M.M.W.R. 49(08):149-153.
Centers for Diseases Control- 1997.National Antimicrobial Resistance Monitoring System –1997 Annual Report. http://www.cdc.gov/ publications.
Centers for Diseases Control- 1998.National Antimicrobial Resistance Monitoring System –1998 Annual Report. http://www.cdc.gov/ publications.
Centers for Diseases Control- 1999.National Antimicrobial Resistance Monitoring System –1999 Annual Report. http://www.cdc.gov/ publications.
Chambers H.F., Sande M.A. 1996. Chemotherapy of Microbial Diseases in Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 Edition.
Chersulick E., Petrescu A.M. 1997. Studiul sensibilităţii tulpinilor de Pseudomonas aeruginosa faţă de antibiotice din clasele betalactamine, aminoglicozide, quinolone şi polipeptide . Congresul IV al Societăţii Ştiinţifice a Epidemiologilor, Microbiologilor şi Parazitologilor din Republica Moldova, 11-12 septembrie 1997,caiet de rezumate, p 26.
Clark P.D. 1999. Phisiology of Plasmids in Biochemistry and Physiology of Microorganisms,Southern Illinois University, www.science.siu.edu /microbiology/ micr460.
C.CLIN – Ouest. 2000. Surveillance des bacteries multiresistantes. Programme 2000. http://www.ccr.jussieu.fr/cclin.
C.CLIN Sud-Ouest. 1999. Enquete de prevalence des infections nosocomiales. Guide methodologique. http://www.ccr.jussieu.fr/cclin.
Cockerill III F.R. 1999. Genetic Methods for Assesing Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemoth. 43 (2): 199 – 212.
Codiţă I., Dorobăţ O. 1998. Aspecte actuale privind rezistenţa la antibiotice a stafilococilor. Rev. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. 43 (1-2): 69-77.
Codiţă I., Dumitrescu V., Grigore L., Buga J. 1999. Sensibilitatea la vancomicină a unor tulpini de stafilococ izolate în anul 1998 în România.Studiu multicentric. Comunicare la al V-lea Congres Naţional de Microbiologie, Bucureşti, Volum de rezumate, p. 49.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Codiță I., Dumitrescu V., Moldoveanu E. 1999. Testarea meticilinorezistenței la Staphylococcus aureus: standard NCCLS versus standard SFM. Comunicare la al V-lea Congres Național de Microbiologie, , București, volum rezumate, p. 48.
Coffey T.J., Dowson C.G., Daniels M.1995. Genetics and molecular biology of lactam- resistant pneumococii. Microb Drug Resist, 1:29-34,[Abstract, MEDLINE].
Cohen L.M. 1992. Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post-Antimicrobial Era. Science, 257: 1050-1055.
Coman G., Filip R., Petrean E., Butnaru F., Păduraru D., Brumariu O. 2000. Prevalența rezistenței la ciprofloxacină la bacilii gram negativi izolați în infecțiile urinare la copii. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol., 45, 1-2:39-44.
Comite technique national des infections nosocomiales, France. 1999. 100 Recomendation pour la surveillance et la prevention des infections nosocomiales. Deuxieme edition, 1999. http://www.clin.fr.
Cnstantiniu S., Romaniuc A., Onu P., Gogoneață A., Stanciu C., Olteanu C. 1999. Comportamentul față de agenți antimicrobieni al unor bacterii gram-negative izolate din mediul spitalicesc și comunitar. Al V-lea Congres National de Microbiologie, sept.1999, București, caiet de rezumate, p. 67.
Cooke R.P., King T.A.,Watson N.A. 1998. Infection control policies for anaesthetic equipment must be complehensive. J. Hosp. Infect. 39(4):331-332.
Cooksey R.C. 1991, Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents, in Balows A, editor, Manual of Clinical Microbiology, fifth edition, American Society for Microbiology.
Cordero L., Samones M., Ayers L.N. 1999. Bloodstream infections in a neonatal intensive care units: 12 years experience with an antibiotic control program. Infect.Control Hosp.Epidemiol. 20(4):242-246.
Cristino J.M. 1999. Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria, Int. J. Antimicrob. Agents, 12:199-202.
Crișan A., Nan D., Cerbu M., Nicoară E. 2000. Importanța corelării antibiogramei cu terapia antiinfecțioasă în septicemiile stafilococice. al VIII-lea Congres Național de Boli Infecțioase, volum rezumate p. 127.
Cucu M., Andronache E., Cernescu P., Zavete O. 1989. Microbiologia aerului, obiectelor si suprafetelor in Microbiologie Sanitara (sub redactia Manescu S), p. 15-41, Ed. Medicala, Bucuresti.
D'Amico R., Pifferi S., Leonetti G., Torri V., Tinazzi A., Liberati A. 1998. effectiveness of antibiotic prophylaxis in critically ill adult patients: systematic review of randomised controlled trials. BMJ, 316:1275-1285.
Daniels I.R., Rees B.I. 1999. Handwashing: simple but effective. Ann.Roy. Surg. Engl. 81(2): 117-118.
Davies J.E. 1994. Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes, Science, 264: 375-381.
Davies, J.E. 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. Ciba Found. Symp. 207:15-27.
Davis J., Wright G.D.1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends Microbiol, 5: 234-240.
Davison H.C., Low J.C., Woolhouse M.E.J. 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it? Trends Microbiol. 8(12):554-559.
Deac L. M. 1997. Infecțiile nosocomiale o permanentă realitate medicală. Editura Dacia, Cluj-Napoca.
Deac L. M., Maximencu S., Stănilă I., Deac D., Mutuleac G., Petcu – Pănoiu R., Roman C. 1995. Infecții nosocomiale înregistrate în unități sanitare de diverse profile. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidmiol. 1-2: 81.
BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dean A.G. 1992. EPIINFO, a word processing, database and statiscics system for epidemiology on microcomputers. WHO/GPA/RES/SFI/92.2 .
Debeleac L., Iancu A., Iancu G., Mateescu M. 1996. Antibiograma. Laborator clinic-Tehnica medicală, 1:14-15.
Debeleac L., Lache M.,Slavov M., Cazacu L. 1999. Studiul sensibilității la antibiotice a tulpinilor de stafilococ patogen izolate în Spitalul Universitar Bucureşti. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti, caiet de rezumate, p. 59.
Degener J.E. 1999. The consequences of bacterial resistance to antibiotics. GeBu 33: 6.
Dever L.L., Smith S.M., Simmons A. 2000. Staphylococcus aureus isolates from patients and staff at a Medical Center: characterization by antibiograms and molecular typing. Am. J. Infect. Control; 21 (2): 117-123.
Diaconu E., Nechifor M. 1988. Antibiotice beta-lactamice. Centrala Ind. De Medicamente si Cosmetice, Bucuresti.
Dinisov C., Ibrahim S., Gherberg-Falnacel M. 2000. Supravegherea epidemiologică şi de laborator privind circulația bacilului piocianic în secțiile Spitalului Județean Constanța, 1992-1998. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. 45 (1-2): 71-77.
Doern G.V. 2000. Antimicrobial Resistance with Streptococcus pneumoniae in the United States. Sem. Resp. Crit. Care Med. 21(4):273-284.
Dorobăț O., Biolan T., Ceauşu E., Calistru P., Burtea M. 2000. Rezistența la antibiotice a tulpinilor de Streptococcus pneumoniae izolate într-un spital de boli infecțioase in 1997 – 1999. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. 45 (1-2):29-38.
Drăgoi A., Hara L., Mitache E., Antonică D., Iacovoiu R. 2000. Studiu comparativ al rezistenței la agenți antimicrobieni a tulpinilor izolate între anii 1997 – 1999 în laboratorul de microbiologie al Institutului de Boli Infecțioase "Prof. Dr. Matei Balş" Bucureşti., al VIII-lea Congres Național de Boli Infecțioase, caiet de rezumate p. 144.
Drăgoi A.M. 1999. Cercetări asupra hepatitelor posttransfuzionale. Al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti. Volum de rezumate p. 97.
Duca E., Duca M., Furtunescu G. 1979. Microbiologie medicală. Editura Didactică şi Pedagogică , Bucureşti.
Dumea E., Rugină C.N., Rugină S., Lungu C.S. 1999. Rezistența la antibiotice a bacililor gram-negativi izolați din uroculturi în Spitalul Municipal Constanța. Prima Conferință Națională de Chimioterapie Antibacteriană, Antivirală şi Antifungică, sept. 1999, Iaşi, caiet de rezumate, p. 123.
Dumitrescu V.,Romanescu Gh. 1968. Infecțiile intraspitaliceşti. Ed. Medicală, Bucureşti p.14.
Ebner W., Kropec-Hubner A., Daschner F.D. 2000. Bacterial resistance and overgrowth due to selective decontamination of the digestive tract. Eur. J. Clin. Infect. Dis., 19(4):243-247. [Abstract, Medline].
Edberg S.C. 1983. Antibiotics and Infection, Churchill Livingstone, New York.
Elliott T.S. Tebbs S.E. 1998. Prevention of central venous catheter-related infection. J. Hosp. Infect. 40(3): 193-201[Abstract, MEDLINE].
Emmerson A.M. 1995. The impact of surveys on hospital infection. J. Hosp. Infect. 30 Suppl: 421-40.
Emori T.G., Culver D.H., Horan T.C., Jarvis W.R. et al. 1991. National nosocomial infection surveillance system (NNIS):description of surveillance methods. Am. J. Infect. Control 19(1): 19-35.
Emory T.G., Gaynes R.P. 1993. An overview of nosocomial infections including the role of the microbiology laboratory., Clin. Microb. Rew. 6:428-442.
Eremia T., Brăileanu E., Berindei A., Chiva E., Ghițescu E., Lazăr L. 1989. Microbiologia apei în Mănescu S. (sub redacția) Microbiologia sanitară. Editura Medicală, p.42-137.
European Centre for the Epidemiological Monitoring of AIDS. 1997. HIV/AIDS Surveillance In Europe. First Qurtely Report – 1997, p. 20-21.
UMF IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fiett J., Paucha A., Miczyska B., Stankiewicz., Mordarska P.H., Hryniewicz W., Gniadkowski M. 2000. A Novel Complex Mutant-Lactamase, TEM-68, Identified in a Klebsiella pneumoniae Isolate from an Outbreak of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing Klebsiellae. Antimicrob. Agents. Chemother. 44(6):1499-1505.
Filip R., Yuan M., Hall L.M.C., Livermore D.M. 1999. Bazele variației în rezistența la betalactamine pentru tulpinile de Klebsiella oxytoca hiperproducătoare de betalactamază K1. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, București. caiet de rezumate p. 64.
Finkelstein R., Kassis E., Reinhertz G., Gorenstein S., Herman P. 1998. Community-acquired urinary tract infection in adults: a hospital viewpoint. J.Hosp. Infect. 38(3): 193-202 [MEDLINE].
Flaherty J.P., Weinstein R.A. 1996. Nosocomial infection caused by antibiotic-resistant organisms in the intensive-care unit. Infect. Control Hosp. Epidemiol.17:236-248.
Flanagan P. 1999. Beta lactams in Antibiotics systemic Review 1 . Lecture 11. http://archive.uwcm.ac.uk/publish/curricula/medical/ medbiol / year2/ lecture11. html
Francioli P, Nahimana I, Widmer A . 1996. Infections du site chirurgical: revue, Swiss-Noso, 3, 1:1-15.
French G.L., Cheng A.F. 1991. Measurement of the costs of hospital infection by prevalence surveys. J. Hosp.Infect. Suppl. A: 65-72.
Fridkin S.K., Gaynes R.P. 1999. Antibiotic resistance in intensive care units. Clin.Chest Med. 20(2):303-316.
Furrer H., Francioli P. 1996. Hemodialyise et infections nosocomiales. Swiss-NOSO 3(2):11-13.
Gachie J.P., Astagneau P., Savey A., Parneix P., Branger B., Gayet S., Lepoutre A., Dumartin C., Carlet J. 2000. Prevalence of Nosocomial Infections in France: results of the 1996 Nation-wide Survey. 4 Decennial International Conference on Nosocomial and Healthcare Associated Infections. Atlanta. Abstracts book: P-T1-26.
Garau J., Xercavins M., Carballeira M.R., Coll I. 1999. Emergence and Disemination of Quinolone-Resistant Escherichia coli in the Community. Antimicrob. Agents Chemother. 43 (11):2736 – 2741.
Garner J.S, Simmons B.P.. 1983. CDC Guideline for Isolation Precautions in Hospitals., Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia.
Garner J.S., Jarvis W.R,, Emori T.J., Horan T.C., Hugues J.M. 1988. C.D.C. definitions for nosocomial infections – 1988, Am. J. Infect. Contr., 16:128-140.
Gavrilă I., Păscariu C. 1976. Septicemiile. Editura Medicală, București, p.3.
Gaynes R. 1997.The impact of antimicrobial use on emergence of antimicrobial-resistant bacteria in hospitals. Infect. Dis. Clinics North Am; 11: 757-765.
Gaynes R. 2000. Surveillance of Nosocomial Infections. Infect. Control Hosp.Epidemiol. 18(7):1-7.
Gaynes R., Monnet D. 1997. The contribution of antibiotic use on the frequency of antibiotic resistance in hospitals. Ciba Found. Symp. 207: 47-56.
George A.M. 1996. Multidrug resistance in enteric and other Gram negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 139:1-10.
Glauser M.P., Jarvis W.R., Noskin G.A., Pujol M., Patterson J.E. 2000. Global Antibiotic Resistance in the Hospital Setting: Trends, Impact, and Successful Interventions for the Prevention and Management of Outbreaks. http://www.medscape.com/CMECircle/ID /2000/pnt-CME02.html.
Goldmann D.A. 1991. The role of barrier precautions in infection control. J. Hosp. Infect. 18:515-523 [Abstract. MEDLINE].
Goldmann D.A., Weinstein R.A., Wenzel R.P., Tablan O.C., Duma R.J., Gaynes R.P. et al. 1996. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals. A challenge to hospital leadership. JAMA. 275: 234-240.
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Goldstein F.W., Pean Y.,Gertner J. 1995. Resistance to ceftriaxone and other β-lactams in Community. Antimicrob. Agents Chemotherap. 39(11): 2516-2519.
Grenier B. 1999. Principes de precaution et antibiotherapie. Antibiotiques, 1: 197-200.
Grigore L., Poiată A. 1999. Terapia antimicrobiană a septicemiilor cu bacili gram negativi, în Nechifor M., Diaconu E. (sub redacția) Actualități în chimioterapia antibacteriană, 1999, Ed. Timpul, Iași, p.101-114.
Guillemot D.1999. Antibiotic use in humans and bacterial resistance, Current Opinion in Microbiology 1: 494-498.
Haines K.A., Klein D.A., McDonnell G., Pretzer D. 1997. Could antibiotic-resistant pathogenes cross-resistant to hard surface disinfectants?. AJIC Am. J. Infect. Control. 25:439-441 [MEDLINE].
Haley R.W. 1992. The development of infection sueveillance and control programs. in Bennet J.V., Brachman P.S. Hospital Infections. 3rd ed. Boston, Ed. Little, Brown&Co Inc, p. 63-78.
Harbarth S., Samore M.H., Lichtenberg D., Carmeli Y. 2000. Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effect on surgical site infection and antimicrobial resistance. Circulation. 101(25):2916-2921. [Abstract, Medline].
Harrison P.F., Lederberg J. 1998. Antimicrobial Resistance: Issues and Options. Insitute of Medicine. Nat. Acad.Press. Washington DC.
Hayes J.D., Wolf C.R. 1990 Molecular mechanisms of drug resistance, Biochem. J. 272:281-295 [Abstract, MEDLINE].
Hector R.F. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. Clin.Microb.Rev. 6:1-21, [MEDLINE].
Hersh B.S., Popovici F., Apetrei R.C., Zolotuşcă L., Beldescu N., Calomfirescu A. 1991.Acquired Immunodeficiency Virus in Romania. Lancet. 338: 645-649.
Hiom S.J., Furr J.R., Russell A.D., Dickinson J.R. 1992. Effects of clorhexidine diacetate on Candida albicans, C glabrata şi Saccharomyces cerevisiae.; J. Appl. Bacteriol. 72:335-340 [MEDLINE].
Holton J., Nye P., McDonald V. 1994. Efficacy of selected disinfectants against Mycobacteria and Cryptosporidia. J. Hosp. Infection 27: 105-115.[Abstract, MEDLINE].
Holton J., Shetty N., McDonald V. 1995. Efficacy of Nu-Cidex (0.35% peracetic acid). J.Hosp.Infect. 30:237-40, [Abstract, MEDLINE].
Honore N., Cole S.T. 1993. Molecular basis of rifampicin resistance in Mycobacterium spp. Antimicrob. Agents Chemoterap, 37:414-418.[Abstract MEDLINE]
Hooton T.M., Levy S.B. 2000. Confronting The Antibiotic Resistance Crisis: Making Appropriate Therapeutic Decisions in Community Medical Practice. http://www. com/Medscape/ID/TreatmentUpdate/toc-tu01.html.
Hughes J.H., Biedenbach D.J., Erwin M.E., Jones R.N. 1993. E-test as susceptibility test and epidemiological tool for evaluation of Neisseria meningitidis isolates. J.Clin. Microb. 31(12):3255-3259[Abstract].
Huovinen P., Cars O. 1998. Control of antimicrobial resistance:time for action. B.MmJ. 317:613-614.
Iacob S., Rebedea I., Burcea H., Palaghița M., Luminos M., Duma D., Mitache I. 1999. Sensibilitatea comparativă a tulpinilor de Staphylococcus aureus la cefuroximă față de oxacilină., Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti, caiet de rezumate, p. 60.
Iacob S., Rebedea I., Burcea H., Palaghița M., Luminos M., Mitache I., Iacob G. 1999. Rezistența la oxacilină a tulpinilor de Staphylococcus aureus comparativ 1999 / 1998. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti, caiet de rezumate, p. 59.
Iacob S., Rebedea I., Palaghița M., Luminos M., Duma D., Mitache I. 1999. Staphylococcus aureus, un germen încă sensibil la macrolide. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti, caiet de rezumate, p. 59.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ionescu G., Neguț M. 1999. E-test versus alte metode de testare a sensibilității la antibiotice. Referat la al V-lea Congres Național de Microbiologie, Bucureşti, caiet de rezumate p. 46.
Ionescu V., Giubelan L. 2000. Observații asupra pneumoniei cu Streptococcus pneumoniae. Poster, Al VIII-lea Congres Național de Boli Infecțioase, mai 2000, Constanța. caiet de rezumate p. 376.
Jacoby G.A., Archer G.L.1991. New Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. N. Engl. J. Med, 324: 604.
Jarvis W.R. 1996. Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. Infect Control Hosp Epidemiol 17 (8): 552 - 557.
Jenner E.A., Mackintosh C., Scott G.M. 1999. Infection control-evidence into practice. J. Hosp. Infect. 42:91-104.
Jones D.R. 1999. Bacterial resistance and topical antimicrobial wash products. AJIC Am. J. Infect. Control. 27: 351-363.
Jones M.E., Peters E., Weersink A-M, Fluit A., Vehoef J. 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria, Research Letter, vol 349, [www. thelancet.com].
Jones R.N. 1996. Impact of Changing Pathogens and Antimicrobial Susceptibility Patterns in the Treatment of Serious Infections in Hospitalized Patients. Am. J. Med. 100 (suppl 6A): 3S-12S.
Jones R.N., Biedenbach D.J., Johnson D.M. 2000. Antimicrobial Activity of Trovafloxacin Tested Against Streptococcus pneumococcus Isolates in 1998 – 1999. Antimicrob. Agents Chemother. 43(2): 216-219.
Kaplan L.S., Mason,jr. E.O. 1998. Management of Infections due to Antibiotic-Resistant Streptococcus pneumoniae.Clin.Microbiol.Rew. 11(4):628-644.
Kaufman D., Haas C.E., Edinger R., Hollick G. 1998. Antibiotic susceptibility in the surgical intensive care unit compared with the hospital-wide antibiogram. Arch Surg. 133(10): 1041-1045.[MEDLINE].
Kenneth T. 1996. Bacterial Resistance to Antibiotics in Bacteriology Lecture Topics, University of Wisconsin Department of Bacteriology.http://www.bact.wisc.edu/Bact330/ lectures.
Klein R.S. 1991. Universal precautions for preventing occupational exposures to human immunodeficiency virus type 1. Am J Med 90:141-153 [Abstract. MEDLINE].
Klepser M.E., Patel K.B., Nicolau D.P., Quintiliani R., Nightingale C.H. 1995. Comparison of the Bactericidal Activities of Ofloxacin and Ciprofloxacine Alone and in Combination with Ceftazidime and Piperacillin against Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. , 39 (11): 2503- 2510.
Kluytmans J.A., Mouton J.W., Vandenbergh M.F., Manders M.J., Maat A.P., Wagenvoort J.H., et al. 1996. Reduction of surgical-site infections in cardiothoracic surgery by elimination of nasal carriage of Staphylococcus aureus. Infect. Control Hosp. Epidemiol 17:780-785 [MEDLINE].
Kohn L., Corrigan J., Donaldson M. 1999. To err is human: building a safe health system. Institute of Medicine, Washington DC. National Academic Press.
Korvick J.A., Bryan C.S., Farber B., Beam jr. T.R., Schenfeld L., Muder R.R., Weinbaum D., Lumish R., Gerding D.N., Wagener M.M. 1992. Prospective observational study of Klebsiella Bacteremia in 230 patients: outcome for antibiotic combinations versus monotherapy. Antimicrob. Agents Chemother. 36(12):2639-2644.
Kotilainen H.R., Zanoli C., lai K.K. 1993. Glutaraldehyde concentration in automatic endoscope washers and monitoring systems. AJIC Am. J. Infect. Control 21:82. [Abstract, MEDLINE].
Kreiswirth B., Kornblum J., Arbeit R.D. et al. 1993. Evidence for a clonal origin of methicilin resistance in Staphylococcus aureus. Science, 259: 227-230.
Kretzer E.K., Larson E.L. 1998. Behavioral interventions to improve infection control practices. AJIC Am J Infect Control 26: 245-253.
Kumari D.N., Haji T.C., Keer V., Hawkey P.M., Duncanson V., Flower E. 1998. Ventilation grilles as a potential source of methicillin-resistant Staphylococcus aureus cauzing an outbreak in
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

an orthopaedic ward at a district general hospital. J. Hosp. Infect. 39(2): 127-133 [Abstract, MEDLINE].
Larson E.L. 1995. APIC Guideline for handwashing and hand antisepsis in health care settings. AJIC Am. J. Infect. Control, 23: 251-269.
Larson E.L., Kretzer E.K. 1995. Compliance with handwashing and barrier precautions. J. Hosp. Infect. 30: 88-106 [MEDLINE].
Lăcătuş C., Pojar P., Bădescu A., Stoica C., Constantiniu S. 2000. Urmărirea rezistenței la antibiotice a unor tulpini de Escherichia coli în funcție de biotop. Al VIII-lea Congres Național de Boli Infecțioase, Constanța, caiet de rezumate, p. 256.
Lee J.T. 1992. Wound infection surveillance. Infect. Dis. Clin. North. Am. 6: 643-656 [Abstract. MEDLINE].
Lee T.B., Baker O.G., Lee J.T., Scheckler W.E., Steele L., Laxton C.E. 1998. Recommended Practices for Surveillance. Am. J. Infect. Control. 26(3): 277-288.
Leong D., Dorsey C., Klapp M. 1987. Dilution of glutaraldehyde by automatic endoscope machine washers: the need for a quality control program, AJIC Am. J. Infect. Control 15:86 [Abstract, MEDLINE].
Levin S.A., Andreasen V. 1999. Disease transmission dynamics and the evolution of antibiotic resistance in hospitals and communal settings. Proc. Natl. Acad.USA 96:800-801.
Levy S.B. 1988. Tetracyclin resistance determinants are widespread, ASM News 54: 418-421 [Abstract, MEDLINE].
Levy S.B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother, 36:695-703 [Abstract, MEDLINE].
Levy S.B. 1997. Antibiotic Resistance: An Ecological Imbalance, Ciba Foundation Symposium 207:1-14.
Levy S.B. 1998. The Challenge of Antibiotic Resistance. Sci. Am. 278(3): 46-53.
Levy SB. 1992. The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroing the miracle. New York: Plenum, [MEDLINE].
Livermore D.M. Editorial. ARMRL Newsletter, December 2000, p.1.
Livermore D.M. 1998. B-Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J. Antimicrob.Chemother. 41, Suppl D: 25-41.
Livermore D.M., Davy W.M. 1991. Invalidity for Pseudomonas aeruginosa of an accepted model of bacterial permeability to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother, 35: 916-921 [Abstract,MEDLINE].
Livermore D.M., Macgowan A.P., Wale C.J. 1998. Surveillance of antimicrobial resistance.B.M.J. 317:614-615.
Livermore D.M. 1995. Betalactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin. Microbiol. Rew. 8(4):557-584.).
Livrelli V., De Champs C., Di Martino P., Darfeuille-Michaud A., Forestier C., Joly B. 1996. Adhesive Properties and Antibiotic Resistance of Klebsiella, Enterobacter,and Serratia Clinical isolates Involved in Nosocomial Infections. J. Clin. Microbiol. 34(8): 1963-1969.
Lyon B.R., Skurray R.A. 1987, Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. Microbiol. Rev. 51:83-134.[MEDLINE].
Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E. 1992. Antimicrobial therapy in Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York.
Manuel R.J., Kibbler C.C. 1998. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. J. Hosp. Infect. 39(2): 95-109.
Marcu G.M., Marcu A. 1984. Metodologia generală a anchetelor epidemiologice descriptive în Caiet metodologic, Institutul de Igienă şi Sănătate Publică, p. 3-48.
Marcu G.M., Marcu A. 1985. Metodologia generală a anchetelor epidemiologice analitice în Caiet Metodologic, Institutul de Igienă şi Sănătate Publică, p. 3-32.
BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Marty L., Jarlier V. 1997.Surveillance des bacteries multiresistantes a partir du laboratoire. CLIN Bulletin, 8:2-4.
Maxwell A. 1992. The molecular basis of quinolone action. J. Antimicrob Chemother. 30: 409-414.
Mayer, KH., Opal, S.M., Medeiros, A.A. 1995. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, edited by Mendell G.L., Bennet J.E., Dolin R., pp 121-225. Churchill Livingstone, New York.
McCornick B.J. 1998, Epidemiology of emerging / reemerging antimicrobial resistant bacterial pathogens. Current Opinion Microb. 1: 125-129.
McDonnel G., Russell A.D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. Clinical Microbiology Reviews, 12(1): 147-179.
McGowan J.E., Metchock B.G. 1996. Basic microbiological support for hospital epidemiology. Infect. Control Hosp. Epidemiol.17:298-303.
McGowen J.E. 1994. Do intensive hospital antibiotic control programs prevent the spread of antibiotic resistance? Infect. Control Hosp. Epidemiol. 15:478-483.
Mehtar. S. 1993. How to cost and fund an infection control programme. J. Hosp. Infect. 25(1):57-69.
Meier C.R. 2000. Antibiotics in the prevention and treatment of coronary heart disease. J.Infect. Dis. Suppl 3: S558-S562. [Abstract, Medline].
Mihalcu F., Pană M. 1994. Penicillin Resistant and Multiple Resistant Pneumococci in a Care Center in Bucharest – Romania. Rom. Arch. Microbiol. Immunol. 53 (3): 151-159.
Miller P.J., Farr B.M., Gwaltmz J.M. jr. 1989, Economic benefits of an effective infection control program: case study and proposal. Rev Infect.Dis. 11: 284-8[Abstract. PubMed].
Ministerul Sănătății, 1994. Ordinul M.S. Nr.984/23.06.1994 pentru aprobarea Normelor privind organizarea supravegherii, prevenirii şi controlului infecțiilor nosocomiale.
Molnar B.G. 1999. Hepatita virală B. Endemia actuală şi aspectele socio-epidemiologice ale profilaxiei. Raport la Simpozionul Sanofi Diagnostic Pasteur, Bucureşti, iulie 1999.
Montay V., Alfandari S., Senneville E., Guery B., Georges H., Leroy O., Beuscart C., Beaucaire G. 1998. Evaluation of prescription of antibiotics in an intensive care unit. Presse Med. 18(27):700-704 [MEDLINE].
Moraru D., Tarloiu D., Cardei E., Oltean C., Coman G. 1999. Aspecte actuale ale sensibilității Enterobacteriaceelor patogene. Prima Conferință Națională de Chimioterapie Antibacteriană, Antivirală şi Antifungică, caiet de rezumate p. 127.
Morris A., Kellner J.D., Low D.E. 1998. The superbugs: evolution, dissemination and fitness. Current Opinion in Microbiology 1:524-529.
Mouton R.P., Hermans J., Simmoons-Smit A.M. et al. 1990. Correlation between consumption of antibiotics and methicillin resistance in coagulase negative staphylococci. J. Antimicrob. Chemotherap. 26:573-583 [Medline].
Murray B.E. 1992. Beta-lactamase-producing enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 2355-2359 [Abstract, MEDLINE].
Musser J.M., Kapur V. 1992, Clonal analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer andrecombination. J.Clin. Microbiol. 30: 2058-2063.
Myllote J.M., Graham R., Kahler L., Young L., Goodnough S. 2000. Epidemiology of nosocomial infection and resistant organisms in patients admitted for the first time to an acute rehabilitation unit. Clin. Infect. Dis. 30(3): 425-432.
National Institute of Occupational Safety and Health. 1981. Formaldehyde: evidence of carcinogenity. NIOSH Publication [Abstract, MEDLINE].
Nechifor M. 1999. Progrese în farmacologia antibioticelor beta-lactamice in Nechifor M, Diaconu E. Actualități în chimioterapia antibacteriană, Ed. Timpul Iaşi, p.113-148.

UMAE UNIVERSITY LIBRARY

Negruțiu L., Bota K., Vancea D., Tudorache V., 1999. Antibioticorezistența Streptococcus pneumoniae în pneumonia bacteriană acută comunitară a adultului. Referat la Conferința medicilor militari infecționiști și epidemiologi, oct. 1999, Craiova.
Nemet C., Idomir M., Constantinescu C., Constantinescu M. 1999. Aspecte privind etiologia infecțiilor urinare și sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor bacteriene implicate. Bacteriol.Virusol.Parazitol.Epidemiol. 44, 3-4:193-198.
Neu H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance, Science, 257:1064.
Neu H.C., Gootz T.D. 1998. Antimicrobial Chemotherapy, http://129.109.136. 65/ microbook/ch011.htm .
Nikaido H. 1994, Prevention of Drug Access to Bacterial Targets:Permeability Barriers and Active Efflux, Science, 264: 382-388.
Nikaido H. 1996. Multidrug efflux pomps of Gram negative bacteria. J. Bacteriol. 178: 5853-5859 [Abstract, MEDLINE].
Nikaido H., Thanassi D.G. 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples.Antimicrob. Agents Chemother. 37:1393-1399.[MEDLINE].
Nikaido H.1998. Multiple antibiotic resistance and efflux, Current Opinion in Microbiology, 1:516-523.
Noble M.A., Isaac-Renton J.L., Bryce E.A., Roscoe D.L., Roberts F.J., Walker M., Walsh A. 1998. The toilet as a transmission vertor of vancomycin-resistant enterococci. J. Hosp. Infect. 40(3): 237-241[Abstract, MEDLINE].
Ordeanu V., Ionică M. 1996. Computerized study of pathogens germs resistance dynamics. First Congres of Balkan Military Medicine, 1996, Istambul, Turcia, Abstract Book, p. 118.
Ordeanu V., Paul F., Ionică M., Cârciumaru B., Ordeanu A. 2000. Studiu statistic de microbiologie clinică privind betalactaminele de uz terapeutic. Al VIII-lea Congres Național de Boli Infecțioase, volum rezumate p. 260.
Ordeanu V., Paul F., Voicu V.A., Ionică M. 1999. Sensibilitatea celor mai frecvente bacterii patogene față de principalele grupe de antibiotice. Prima Conferință Națională de Chimioterapie Antibacteriană, Antivirală și Antifungică, Iași. Volum de rezumate, p. 129.
Ordeanu V., Voicu V.A., Paul F., Ionică M. 1999. Studii statistice de microbiologie clinică pentru optimizarea terapiei antimicrobiene. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, București, caiet de rezumate, p. 71.
Palmer N.A., Pealing R., Ireland R.S., Martin M.V. 2000. A study of prophylactic antibiotic prescribing in National Health Service general dental practice in England. Brit.Dent. J. 189(1):43-46. [Abstract, Medline].
Pană M., Ungureanu V., Mihalcu F., Vereanu A., Stanescu C. 1997. Study of Resistant Pneumococci in Romania Between 1973-1995.; Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Press, New York, 1997; vol. 418: 471-473.
Paul F. "Teza de Doctorat in Medicina", Universitatea de Medicina si Farmacie "Carol Davila" Bucuresti, 1991.
Paul F., Mocanu G., Ordeanu V. 1999. Dinamica rezistenței stafilococilor la antibitice. Prima Conferință Națională de Chimioterapie Antibacteriană, Antivirală și Antifungică, Iași. caiet de rezumate, p. 131.
Paul F., Mocanu G., Ordeanu V. 1999. Dinamica sensibilității Escherichia coli la antibiotice. Poster, al V-lea Congres Național de Microbiologie, București. caiet de rezumate, p. 66.
Paul F., Ordeanu V., Poștoarcă A. 1999. Abordare epidemiologică a contaminării fungice și micotoxicologice a alimentelor. Poster, Al V-lea Congres Național de Microbiologie, București. Caiet de rezumate, p. 87.
Paul F., Rascu D., Mihailescu M., Ionescu M. 1993. Portajul de stafilococ auriu la personalul serviciului de chirurgie din Spitalul Militar Central. Raport intern, nepublicat.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pearson M.L. 1996. Guideline for prevention of vascular-device-related infections. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 17:438-473.
Pedersen G., Schonheider H.C., Steffensen F.H., Sorensen H.T. 1999. Risk of resistance related to antibiotic use before admission in patients with community-acquired bacteraemia. J. Antimicrob. Chemother. 43:119-126.
Peled I.J., Dvir G., Berger J., Ullmann Y., Nachlieli T. 2000. Prophylactic Antibiotics in Aesthetic and Reconstructive Surgery. Aesthetic Plast. Surg. 24(4): 299-302.
Petrosino J., Cantu C., Palzkill T. 1998. β-lactamases: protein evolution in real time, Trends Microbiol 6(8): 323-327.
Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G. Y., Kugler K. and SENTRY participants group. 1998. Bacterial Pathogens Isolated from Patients with Bloodstream Infection: Frequencies of Occurence and Antimicrobial Susceptibility Patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997). Antimicrob. Agents Chemother. 42(7):1762-1770.
Pitout J.D.D., Moland E.S., Sanders C.C., Thomson K. S., Fitzsimmons S.R. 1997. β-Lactamases and Detection of β-Lactam resistance in Enterobacter spp. Antimicrob. Agents Chemotherap. 41(1): 35-39.
Pittet D., Dharan s., Touveneau S., Sauvan V., Perneger T.V. 1999. Bacterial Contamination of the Hands of Hospital Staff During Routine Care. Arch. Intern. Med. 159: 821-826
Pittet D., Ruef C. 1995. Prevention de l'infection urinaire chez le patient sonde, Swiss-NOSO 2(1):2-3.
Pittet D., Li N., Wenzel R.P. 1993. Associoation of secondary and polymicrobial nosocomial bloodstream infections with higher mortality. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 813-819[Abstract, MEDLINE].
Podani M., Aramă V., Benea O., Mitache E., Chiotan M. 1999. Rezistența la antibiotice a pneumococului izolat între 1989-1998 în Institutul de Boli Infecțioase "Matei Balş".; Al V-lea Congres Național De Microbiologie.Poster, caiet de rezumate, p.63.
Podschun R., Ullmann U. 1999. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin. Microbiol. Rew. 11(4):589-603.
Poiată A., Bădicuț I., Tuchilus C., Buiuc D. 2000. Activitatea comparativă in vitro a unor chinolone moderne. Al VIII-lea Congres Național de Boli Infecțioase, Constanța, 2000. Volum de rezumate, p.263-264.
Poiată A., Tuchilus C., Lăcătuş C., Constantiniu S., Bădicuț I.,Buiuc. 1999. Incidence of Resistance in Enterobacteriaceae isolates from Eastern Romania. Al V-lea Congres Național de Micribiologie. Poster, caiet de rezumate, p. 63.
Ponce de Leon-Rosales S.P., Molnar-Rams F., Domiguez-Cherit G., Rangel-Fausto M.S., Vazquez-Ramos V.G. 2000. Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study. Crit. Care Med. 28(5):1316-1321[Abstract, MEDLINE].
Popa C. 1999. E-Test, o nouă metodă pentru testarea rezistenței la substanțele antimicrobiene. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. 44 (1-2):127-130.
PSL GROUP. 1997. Antibiotic-Resistant Infections Triple Cost And Length Of Hospitalization. http://www.pslgroup.com/dg/3A9F6.htm.
Pugliese G, Hunstiger CA1992:. Central services, linens, and laundry. In: Bennett J.V., Brachman P.S. Hospital Infections. 3rd ed. Boston, MA: Little, Brown & Co Inc, p. 335-344.
Raad I., Darouiche R., Hachem R., Sacilowski M., Bodey G.P. 1995. Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. Antimicrob. Agents Chemother. 39(11):2397-2400.
Ray P.H. 1995, Integrons: novel mobile genetic elements mediating antibiotic resistance in enterobacteria and Pseudomonas. APUA Newsletter,13(3):1, 4-6.
Rebedea I. 1997. O nouă etiologie a hepatitelor virale – Flavivirusul hepatic G. Medicina Modernă IV(4):181-184.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Recchia G.D., Hall R.M. 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons, Trends Microbiol, 5:389-394 [Abstract, MEDLINE].
ResistanceWeb. 2000. Susceptibility of P. aeruginosa to antibiotics. Http://www. resistanceweb.pharmacy-ce.org/all-s-y.asp.
Rhame FS. 1992.The inanimate environment. In: Bennett JV, Brachman PS, eds. Hospital Infections. 3rd ed. Boston, MA: Little, Brown & Co Inc. p.299-333.
Richards M.J., Eduards J.R., Culver D.H., Gaynes R.P., 1999. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in United States. Pediatrics,1999, 103(4): 391-397 [Abstract, MEDLINE].
Rigdway G.L. 1995. Antimicrobial Agents in Pattison J.R., Grunenberg R. N., Holton J., Rigdway G.L., Scott G., Wilson P.R. A Practical Guide to Clinical Bacteriology, John Wiley & Sons.
Risi G.F., Tomascak V. 1999. A simple hand hygiene exercise. Am. J. Infect. Control. 27(4): 370-372.
Rojo D., Pinedo A., Clavijo E., Garcia-Rodriguez A., Garcia V. 1999. Analisys of risk factors associated with nosocomial bacteraemias. J. Hosp. Infect. 42:135-141.
Rugina C.N., Rugina S. 1999. Studiul sensibilității la antibiotice a bacililor gram negativi izolați în perioada 1996-1999 în Spitalul Clinic Municipal Constanța. Al V-lea Congres National de Microbiologie, Bucuresti; caiet de rezumate, p.67.
Rugină C.N., Dumea E., Rugină S. 2000. Comparație privind sensibilitatea in vitro la aminoglicozide. Al VIII-lea Congres National de Boli Infecțioase, Constanța. caiet de rezumate, p.273.
Rupp M.E., Hamer K.E. 1998. Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis. J.Antimicrob. Chemother.41:155-161.
Russell A.D. 1990. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. Clin. Microb. Rev. 3(1): 99-119.
Russell A.D., Day M.J. 1993. Antibacterial activity of clorhexidine. J. Hosp.Infect. 25: 229- 238. [MEDLINE].
Rusu V. 1987. Caracteristici de susceptibilitate la agenții antimicrobieni a bacteriilor implicate în etiologia infecțiilor respiratorii acute, cu unele considerații de ordin metodologic. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. 32:178.
Rusu V., Dorobăț O., Paicu L. şi colab. Caracteristici actuale şi de tendință a fenomenului de rezistență la agenții antimicrobieni. Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. 27:265.
Rutala W.A. 1996. APIC Guideline for selection and use of disinfectants. AJIC Am. J. Infect. Control, 24: 313 –42.
Rutala W.A., Stiegel M.M., Sarubbi F.A., Weber D.J. 1997. Suscetibility of antibiotic-susceptible and antibiotic resistant hospital bacteria to disinfectants. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 18:417-421 [MEDLINE].
Rutalla W.A., Weber D.J. 1997. Epidemiology: a critical tool for infection professionals. AJIC Am. J. Infect. Control 25:193-194.
Sax H. 2000. Unterhospital Differences in Nosocomial Infections Rates – The Second Swiss Nosocomial Infection Prevalence Study. 4 Decennial International Conference on Nosocomial and Healthcare Associated Infections. Atlanta, Abstracts book: P-T1-21.
Scavizzi M., Labia R., Petitjean O., Elbhar A. 2000. L'antibiograme. De l'analyse des populations bacteriennes a la therapeutique. Antibiotiques 2:122-134.
Schaffler – Microbiologie medicală şi imunologie, p. 51, 1996, Ed. ALL.
Scheckler W.E., Brimhall D., Buck A.S., Farr B.M., Friedman C., Garibaldi R.A., Gross P.M., Harris J.A., Hierholzer W.J., Martone J., McDonald L.L., Solomon S.L. 1998. Requirements for infrastructure and essential activities of infection control and epidemiology in hospitals: A Consensus Panel report. Am. J. Infect. Control..26(1):47-60.

BUAM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Schellick J.A. 1993. The use of statistical process control charts in hospital epidemiology. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 14: 649-656 [MEDLINE].
Schulz G. 1996. Porins: general to specific, native to engineered passive pores. [Review article], Current Opinion in Structural Biology 1, 6: 485-490.
Schwank S., Rajacic Y., Zimmerli W., Blaser J. 1998. Impact of Biofilm Formation on In Vitro and In Vivo Activities of Antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 42(4):895-898.
Schwartz B, Bell DM, Hughes JM. 1997. Preventing the emergence of antimicrobial resistance. A call for action by clinicians, public health offcials, and patients. JAMA 278: 944-945.
Sengupta S., Sirkar A., Shivananda P.G. 2000. Stethoscopes and nosocomial infection. Indian J. Pediatr, 67(3): 197-199 [Abstract, MEDLINE].
Shannon K., Stapleton P., Xiaoqin X., Johnson A.,Beattie H., Bakri F.,Cookson B., French G. 1998. Extended-Spectrum-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Causing Nosocomial Outbreaks of Infection in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 36(10): 3105-3110.
Shlacs DM, Gerding DN, John JS, Craig WA et al. 1997. Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Infect. Control and Hosp. Epidemiol. 18:275-291.
Simmons B.P. 1983. APIC Guideline for hospital environment control. AJIC Am.J. Infect. Control 11:97-115.
Simor A., Loui M., The Canadian Bacterial Surveillance Network, Low D.E. 1996. Canadian National Survey of Prevalence of Antomicrobial Resistance among Clinical Isolates of Streptococcus pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 40(9): 2190-2193.
SMART, 1999. Susceptibility by Organism Type versus Antibiotic. http:// resistanceweb. pharmacy -ce.org.
Souweine B., Traore O., Aublet-Cuvelier B., Bret L., Sirot J., Laveran H., Deteix P. 2000. Role of infection control measures in limiting morbidity associated with multi-resistant organisms in critically ill patients. J. Hosp. Infect. 45(2):107-116.
Spratt B.G. 1994. Resistance to Antibiotics Mediated by Target Alterations, Science, 264: 388-393.
Stacey A., Burden P., Croton C., Jones E. 1998. Contamination of television sets by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Hosp. Infect. 39(3):243-244.
Stapleton P., Wu Pei-Jun, Kink A., Shannon K., French G., Phillips I. 1995. Incidence an Mechanisms of Resistance to the Combination of Amoxicillin and Clavulanic Acid in Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 39(11):2478-2483.
Stickler D.J., Zimakoff J. 1994. Complications of urinary tract infections associated with devices used for long-term bladder management. J. Hosp. Infect. 28: 177–194).
Strausbaugh L.J. 1999. Infection control in long-term care: News from the front. Am. J. Infect. Control 27(1):1-3.
Struelens M. 1998. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. BMJ 317:652-654.
Svenson E., Hanberger H., Nilsson L.E. 1997. Pharmacodynamic effects of antibiotics and antibiotic combination on growing and nongrowing Staphylococcus epidermidis cells. Antimicrob. Agents Chemother. 41(1):107-111.
Swarz M.N. 1994. Hospital-aquired infections: Diseases with increasingly limited therapies. Proc.Natl.Sci.USA, 91:2420-2427.
Teodorescu C., Tutoveanu A., Bărbulescu C. 1999. Infecțiile urinare și dinamica rezistenței lor la antibiotice. Al V-lea Congres Național de Microbiologie, București; caiet de rezumate, p. 68.
Teodorovici Gr., Ivan A. 1981. Hepatita cu virus B în Teodorovici Gr., Ivan A. Orientări în epidemiologia contemporană, Ed. Junimea, Iași, p. 129.
Teodorovici Gr., Ivan A. 1981. Locul infecțiilor nosocomiale in patologia actuală, in Teodorovici Gr., Ivan A. Orientări în epidemiologia contemporană. Ed. Junimea, Iasi.
Tica A.A., Cârlig V. 1998. Antiseptice și dezinfectante , în Cîrlig V., Voicu V., Bădulescu F. Farmacologie, vol II, Ed. Aius, Craiova.

UNIVERSITY LIBRARY

Turcu T., Fîntînaru R., Luca V., Azoicăi D., Leca D., Miftode E., Scurtu R, Luca C. 2000. Sensibilitatea şi rezistenţa faţă de substanţe antimicrobiene a Enterobacteriaceelor şi Pseudomonas implicate în infecţii extraintestinale, 1996-1999. Al VIII-lea Congres Naţional de Boli Infecţioase Constanţa, caiet de rezumate p. 278-279 .
Turcu T., Luca C., Mihalache D., Râpeanu E., Scurtu R. 1999. Sensibilitatea actuală la chimioterapice a Enterobacteriaceelor implicate în infecţii extraintestinale, 1996-1999., Prima Conferinţă Naţională de Chimioterapie Antibacteriană, Antivirală şi Antifungică, caiet de rezumate p. 133.
Ungureanu V., Pana M., Gheorghe M., Dorobăţ O. 1999. Sensibilitatea la penicilină şi alte antibiotice a unor tulpini de Streptococcus pneumoniae izolate din infecţii urinare., Al V-lea Congres Naţional de Microbiologie, Bucureşti, caiet de rezumate, p. 62.
Vague J., Rosselo I., Trilla A., Arribas J.L., Caballero J.G. 2000. Prevalence of Nosocomial Infections in Spain – EPINE Study 1990-1998. 4 Decennial International Conference on Nosocomial and Healthcare Associated Infections. Atlanta .Abstracts book: P-T1-22.
Vatopoulos A.C., Kalapothaki V., Legakis N.J. 1996. Risk factors for nosocomial infections caused by Gram-negative bacili. J. Hosp. Infect. 34(1):11-22.
Vesley D, Norlien K.G., Nelson B., Ott B., Streifel A.J. 1992. Significant factors in the disinfection and sterilization of flexible endoscopes. AJIC Am. J. Infect. Control 20: 291-300 [Abstract, MEDLINE].
Voicu V., Cârlig V., Georgescu C.C., Tica A.A. 1998. Antibiotice şi chimioterapice în Cârlig V., Voicu V., Bărbulescu F., Farmacologie, vol II, Ed. Aius, Craiova.
Voicu V., Ordeanu V., Ionică M. 1994. Sistem computerizat pentru evidenţierea sensibilităţii germenilor patogeni la substanţe antimicrobiene. Revista Sanitară Militară, 2:91-97.
Voiculescu M. 1989. Boli infecţioase, vol I, Ed. Medicală, Bucureşti.
Washington J.A. 1999. The Role of the Mycrobiology Laboratory in Antimicrobial Susceptibility Testing. Infect. Med. 16(8):531-532.
Weber D.J., Raasch R., Rutala W.A. 1999. The Growing Importance of Antibiotic-Resistant Pathogens. Chest, 115, Sppl:34S-41S.
Weber M., Roussel-Delvallez M. 1997. Enquettes epidemiologiques regionales sur la resistance aux antibiotiquesde Streptococcus pneumoniae. Med. Mal. Infect. 27, Special: 7-15.
Weinstein R.A. 1998. Nosocomial Infection Update.Emerging Infectious Diseases, 4(3): 416-420.
Weinstein R.A. 2000. Surveillance Systems That Make a Difference. http://www.medscape.com/medscape/2000/ICAAC/Story_id=1642.
Weinstein R.A. 2000. Infection Control Strategies: The Busier You Are, The Less You Wash. http:// www.medscape.com/Medscape/CNO/2000 NHAI/pnt-NHAI.html.
Weinstein R.A. 1991.Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. Am J Med;91:179-84 [MEDLINE].
Wenzel R.P. 1993. Instituting health care reform and preserving quality: role of the hospital epidemiologist. Clin. Infect. Dis. 17:831-834.
Wenzel R.P., Perl T.M. 1995. The significance of nasal carriage of Staphylococcus aureus and the incidence of postoperative wound infection. J. Hosp. Infect. 31: 13 – 24 [MEDLINE].
Widmer A., Francioli P. 1997. Infections liees a des catheters intraveineux peripheriques. Swiss-NOSO 4(3):22-24.
Widmer A, Jacqueriz G., Francioli P. 1997. Staphylococcus aureus resistants a la vancomycine dans des hopitaux japonais. Swiss-Noso, 4(3): 17-18.
Wille J.C., Alblas B., Thewessen P.M. 1993. Nosocomial catheter-associated bacteriuria : a clinical trial comparing two closed urinary drainage systems. J. Hosp. Infect. 25 : 191–198.
Williams R.E.O. 1970. Changing Perspectives in Hospital Infection. Proceedings of the international Conference on Nosocomial Infections. CDC, Atlanta, US, p. 1-11.

BUAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Wilson A.P. 1995. Antibiotic prophylaxis and infection control measures in minimally invasive surgery. J. Antimicrob. Chemother. 36:1-5.
Wisplinghoff H., Perbix W., Seifert H. 1999. Risck fators for nosocomial bloodstream infections due to Acinetobacter baumannii: a case-control study of adult burn patients. Clin. Infect. Dis. 28(1): 59-66.
Wong E. S. 1999. The price of a Surgical-Site Infection? More than Just Excess Lenght of Stay. Infect. Control Hosp. Epidemiol 20, http://www.iche/stor1199/11ed.htm.
World Antibiotic Resistance Network, 1998. Data Bank,1WARN, www.warn.cas. cz/ 1998.htm.
World Health Organization. 1983. Control of antibiotic-resistant bacteria. Bulletin of the World Health Organization, 61:423-433.
World Health Organization, 1998. The Current Status of Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe. http:www.who.org.
Worman H.J. 1999. The Hepatitis C Virus. http//cpmnet.columbia.edu/dept/gi/ hepC.html.
Wright D.G. 1999. Aminoglycoside-modifying enzymes, Current Opinion in Microbiology, 2: 499-503.
Yates B. 1997. Antibiotic-Resistant Infections Triple Cost And Length Of Hospitalization.URL:http://www.pslgroup.com/dg/ 3A9F6.htm.
Zaragoza M.,Salles M., Gomez J., Bayas J.M., Trilla A. 1999. Handwashing with soap or alcoholic solutions? A randomizaed clinical trial of its effectiveness. Am. J. Infect. Control 27(3): 258-261.
Zarnea G., 1986.Tratat de Microbiologie Generala, vol.III, pg. 97-111, Ed. Academiei Romane.
Zoutman D., McDonald S.,Ventanayagan D. 1998. Total and Attributable Costs of Surgical-Wound Infections at a Canadian Tertiary-Care Center. Infect. Control Hosp. Epidemiol.19:254-259.
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 9.
ORGANISMELE MODIFICATE GENETIC (OMG) SI ROLUL LOR IN BIOTEHNOLOGIA FARMACEUTICA

Biotehnologia modernă oferă noi posibilităţi de dezvoltare în sectoare diverse, de la agricultură la **producţia farmaceutică**, iar dezbaterile la nivel mondial asupra organismelor modificate genetic sunt fără precedent şi au polarizat atenţia oamenilor de ştiinţă, a producătorilor de bunuri alimentare, a consumatorilor, a grupurilor de apărare a interesului public, a instituţiilor publice şi a factorilor de decizie. Punerea la punct a organismelor modificate genetic este astăzi, fără îndoială, un subiect care ridică numeroase probleme de etică referitoare la domeniul agriculturii şi al alimentaţiei. Plantele, microorganismele si animalele modificate genetic sunt create prin utilizarea tehnicilor ingineriei genetice. În ultimii ani, alături de metodele clasice de încrucişare a soiurilor sau de utilizare a îngrăşămintelor, au apărut metode noi, care presupun folosirea unor tehnici specifice ingineriei genetice. Aceste organisme vii nou create de către om nu există în natură, iar impactul lor asupra mediului şi asupra fiinţei umane nu este pe deplin cunoscut şi scapă controlului specialiştilor.

Definitii ale Organismelor modificate genetic (OMG)

În legislaţia din România privind regimul de obţinere, testare, utilizare şi comercializare a organismelor modificate genetic, acestea sunt definite ca reprezentând orice organism, cu excepţia celui uman, al cărui material genetic a fost modificat altfel decât prin încrucişare şi/sau recombinare naturală sau orice entitate biologică capabilă de reproducere sau de transferare de material genetic, conform Legii nr. 214/2002. În Germania, organismele modificate genetic sînt considerate acele organisme al căror material genetic a fost modificat într-un mod care nu se regăseşte în natură, în condiţii naturale sau de recombinare naturală. Organismul modificat genetic trebuie să fie o unitate capabilă de autoreplicare sau transmitere a materialului genetic. În Statele Unite, termenul de organism modificat genetic se referă la plante şi la animale care conţin gene transferate de la alte specii, pentru a obţine anumite caractere, precum rezistenţa la anumite pesticide şi ierbicide. Transferul de gene apare şi în agricultura convenţională, dar, spre deosebire de ingineria genetică, acesta are loc între indivizi aparţinând aceleiaşi specii sau între specii înrudite. Marea diversitate a speciilor de plante şi de animale existente astăzi atestă faptul că întotdeauna s-au produs modificări în zestrea genetică a acestora. Însă, de notat, toate modificările s-au produs treptat, în mod firesc, de-a lungul unor perioade foarte mari de timp şi, un fapt care iarăşi trebuie reţinut, de la sine, fără intervenţia omului. Ingineria genetică este, deci, o nouă tehnologie care implică manipularea genelor. Datorită limbajului universal al genelor (codul genetic), oamenii de ştiinţă pot transfera gene între diferite specii care nu sînt înrudite (animale, plante, microorganisme). Se stie ca in ipoteza ca vom veni in contact cu fiinte rationale de pe alta planeta, genomul omului va fi mai asemanator cu al petuniei, sa zicem, decat al acestora, ceea ce ar insemna ca amestecul cu specii exrtaterestre este imposibil. De exemplu, genele unui peşte pot fi transferate la o plantă de tomate sau la căpşună pentru a le conferi rezistenţă sporită la temperaturi foarte scăzute. Plantele obţinute prin astfel de tehnici de inginerie sunt forţate să producă substanţele chimice ale peştelui, tocmai datorită acestui limbaj universal, ele ajungând să elaboreze o substanţă pe care peştii o produc în mod normal, pentru a supravieţui în apă rece. Prin aceste noi tehnologii, au fost create numeroase plante modificate genetic, prezentate ca având o importanţă majoră în alimentaţie, cum sunt porumbul şi cartofii rezistenţi la insecte, fasolea şi soia tolerante la glifosat (pesticid toxic), roşiile cu coacere întârziată şi cu conţinut ridicat de substanţă solidă. Cât de sănătoase sunt pentru consum este o altă problemă.

În ultima perioadă, au fost create şi organisme modificate genetic în scop nutriţional. Dacă plantele transgenice realizate în scop tehnologic constituie prima generaţie de alimente

BUASVM CLUJ-NAPOCA LIBRARY

modificate genetic, modificările genetice care vizează îmbunătățirea calității nutritive a alimentelor se constituie în a doua generație de astfel de produse. În cadrul acestei noi generații de OMG se includ ***uleiurile*** a căror compoziție a fost modificată în vederea îmbunătățirii raportului între acizii grași saturați și cei nesaturați, *orezul auriu*, cu un conținut mult mai ridicat de provitamina A, ***amidonul*** cu proporția dintre amiloză și amilopectină modificată în vederea creșterii capacității de gelificare etc. Specialiștii apreciază că, prin utlizarea tehnicilor de inginerie genetică, se alterează grav granitele pe care speciile le au în mod natural între ele, de-a lungul evoluției. În opinia unora, combinarea genelor speciilor care nu se înrudesc, prin modificarea permanentă a codului genetic, este posibil ca noile organisme create să transmită urmașilor, prin ereditate, schimbările genetice induse. Mulți experți se tem, nu fără argumente, că ingineria genetică va genera pierderea biodiversității, înlăturând barierele care au protejat integritatea speciilor de-a lungul timpului. Studii efectuate de aceștia demonstrează că introducerea masivă și iresponsabilă în circuitul agricol a plantelor modificate genetic sau transgenice, rezistente la ierbicide, va conduce, treptat, la dispariția unor viețuitoare care se hrănesc cu semințele provenite de la ierburi și buruieni. În ultimele decenii, înrăutățirea condițiilor pedoclimatice, diminuarea progresivă a resurselor naturale și explozia demografică au justificat căutarea unor soluții de diversificare a raselor de animale și a soiurilor de plante, de sporire a productivității culturilor prin creșterea rezistenței la dăunători și la condiții de mediu neprielnice (frig, secetă, soluri sărace etc.) si de modificare în sens favorabil a compoziției chimice. Soluțiile s-au concretizat în aplicarea unor procedee pe cât de necontrolate, pe atât de neștiințifice de modificare a zestrei genetice.

Prin **tehnicile de inginerie genetică**, materialul genetic de interes este transferat de la organismul donor la cel acceptor, în scopul obținerii de organisme cu caracteristici noi, utile omului. Aceste tehnici sunt:

1. recombinarea acizilor nucleici, care implică formarea de noi combinații ale materialului genetic, prin inserția moleculelor de acizi nucleici, obținute prin diferite tehnici în afara unui organism, într-un virus, o bacterie sau alt sistem vector și încorporarea acestora într-un organism gazdă, în care nu există în mod normal, dar care este capabil să continue propagarea;

2. **introducerea directă într-un microorganism** a materialului ereditar preparat în afara microorganismului;

3. fuziunea celulară sau tehnici de hibridizare, în care celulele vii cu noi combinații de material genetic ereditar sunt formate prin fuziunea a două sau mai multe celule, prin metode care nu au loc în mod natural.

Susținătorii tehnicilor de modificare genetică afirmă că utilizarea acestora aduce numeroase avantaje, dar acestea sunt mai ales pentru producătorii și comercianții de plante transgenice:

• reducerea costurilor, deoarece nu mai este necesară tratarea culturilor cu îngrășăminte chimice; consumatorii pot fi însă afectați prin efectele pe termen lung ale alimentării cu produse obținute din aceste culturi.

• creșterea rezistenței la acțiunea dăunătorilor; nimeni nu a putut însă documenta pe termen lung fenomenul, împreună cu implicațiile sale asupra lanțului trofic.

• obținerea unor sporuri importante ale recoltelor; întrebarea este, însă, dacă nu cumva lipsurile cantitative sînt de preferat prejudiciilor cauzate de impunerea plantelor modificate genetic.

• îmbunătățirea caracteristicilor organoleptice ale produselor (gust, culoare, formă); această mutație forțată aduce un câștig aparent, în raport cu niște pierderi sigure.

• prelungirea termenului de valabilitate a produselor, prin creșterea rezistenței la păstrare; profitul este, în realitate, al producătorilor.

In teorie totul sună minunat: plantele transgenice nu mai trebuie tratate cu substanțe chimice, ele fiind rezistente la acțiunea dăunătorilor; în acest fel, se obțin cresteri importante ale recoltelor, dar și produse care nu sînt toxice, ele nefiind tratate chimic. Pe de altă parte, în ameliorarea clasică, prin diverse încrucișări și hibridări, transferul genelor are loc în cadrul unui

proces natural, ce durează mai mulți ani, în timp ce prin tehnicile de inginerie genetică, transferul genelor se face artificial, direct, imediat, rezultatul fiind doar aparent același. Există o serie de întrebări, mai mult sau mai putin incomode, pe care fiecare dintre noi ar trebui să și le pună: Aș mânca **alimente** care conțin sau provin din OMG? As folosi **medicamente** care conțin sau provin din OMG? Ce aș face dacă ar fi mult mai ieftine decât produsele tratate chimic, pe care le accept, sau decât cele naturale? Am încredere în opinia celor care fac cercetare științifică și care evaluează cu metodele lor beneficiile sau riscurile mele atunci când eu consum produse ce conțin OMG? Îmi este suficient să cunosc opinia cercetării pentru a consuma? Este bine să fie alocați bani publici pentru cercetare în domeniul OMG și al biotehnologiilor? Dar bani privați? Este necesar ca producătorii să solicite aprobare, de la o autoritate publică, înainte de a introduce pe piață produse ce conțin OMG? Etichetele produselor mă informează suficient? Producătorii care nu pun etichete, îmi iau ei, astfel, dreptul meu de a alege produse numai în cunoștința de cauza? Există sprijin public suficient pentru ca producătorii români, întreprinderile românești în special cele mici și mijlocii, să transfere rapid în productie, rezultatele activității de cercetare științifică din domeniul științelor vieții, al biotehnologiilor, astfel încât să crească competitivitatea acestor firme pe piețe globale, asa cum se întâmplă în țările dezvoltate? Sunt interesele mele de consumator suficient de bine apărate prin legile și instituțiile existente? Sunt dispus să-mi apăr mai bine interesele prin implicarea mea într-o asociație a consumatorilor? Sunt de acord să nasc un copil pe care, mai întâi, l-am supus unei modificări genetice? Vreau să fiu proprietarul moștenirii mele genetice? Sunt de acord să fiu clonat fără a fi întrebat? Credințele mele îmi permit să fiu de acord să facă omul modificări în structura genetică a organismelor vii? s.a.m.d.

Istoricul cercetarilor OMG

De când practică agricultura și creșterea animalelor, omul a fost mereu interesat să adapteze, cat mai bine, plantele cultivate și animalele domestice la nevoile sale. Până la apariția **ingineriei genetice**, aceste ameliorări s-au realizat prin **selecția indivizilor** care prezentau caracteristici morfologice sau fiziologice interesante, apărute prin mutații spontane, și prin sistemul încrucișare-selecție a hibrizilor dintre soiurile sau rasele aceleiași specii. La animale, încrucișările între specii diferite s-au dovedit a fi dificile și nu au reușit decât între speciile foarte apropiate, dând naștere la hibrizi incapabili de a se reproduce; catârca, obținută din încrucișarea măgarului cu iapa, fiind foarte rar fertilă, iar catârul este întotdeauna steril. La plante, hibrizii apăruți prin încrucișări naturale sau artificiale între specii apropiate sunt, în general sterile, dar fertilitatea lor poate fi, în anumite cazuri, restaurată prin poliploidizare naturală sau artificială. Ca exemplu, cazul de la Triticale, hibrid artificial între grâul tare (*Triticum durum*) și secară (*Secale cereale*); la plantele care se înmulțesc în principal pe cale vegetativă, simpla selecție a mutantelor spontane a contribuit, de asemenea, la sporirea biodiversității plantelor cultivate. Prin suprimarea barierelor naturale, care, până în prezent, împiedicau schimburile de gene între specii și regnuri diferite, geniul genetic permite crearea de organisme transgenice, dotate cu proprietăți noi, total necunoscute înainte și într-un timp scurt, de cativa ani, fără nici o relație cu ritmul multimilenar al evoluției ființelor vii.

Tehnicile transgenezei conferă astfel omului puterea nelimitată teoretic de a modifica patrimoniul ereditar al ființelor care-l înconjoară, inclusiv al propriei sale specii. Este vorba, așadar, de o veritabilă revoluție biologică. Începând cu sfârsitul anilor 1970, interesul **industriilor** s-a îndeptat mai cu seamă spre **microorganismele utilizate în sectoarele alimentare și farmaceutice**:

-Transferarea genei **interferonului uman** (localizată pe perechea a cincea de cromozomi) în plasmide de *Escherichia coli* care, in vitro, producea interferon uman, de circa 200 ori mai ieftin decât cel obținut prin extragerea lui din sânge de om;

-Obținerea unei bacterii care produce un îndulcitor, thaumatina, mult mai puternic decât zahărul și al cărei transgenă provine de la un arbore din Africa de Vest (*Thaumatococcus danielii*, fam. Scitaminaceae).

În 1978 are loc obținerea unei tulpini bacteriene transgenice de *Escherichia coli* care sintetizează **insulină umană**, ca urmare a transferului de gene umane care codifică aceasta proteină. Din 1979 începe comercializarea bacteriei de *Escherichia coli* şi producerea industrială a insulinei în bioreactoare. De asemenea, pornind tot de la această bacterie s-a ajuns la obținerea **hormonului de creştere**, a **interleucinei** cu rol anticancerigen s.a.

Primele experiențe în vederea obținerii de animale transgenice au fost realizate de R. Palmiter şi R. Brinster (1982), cercetători americani (de la Universitățile din Seattle, Philadelphia şi San Diego) care au reuşit transferul genei hormonului de creştere (somatotropina) de la şobolan la şoarece. Gena respectivă a fost prima oară clonată în bacterii pentru obținerea ei în cantități mari. 1983 este anul în care se obține prima plantă transgenică, un tutun rezistent la un antibiotic, datorită transferului unui fragment de plasmică bacteriană care codifică această proprietate. Deşi lipsit de valoare agricolă, acest tutun a conferit realizatorului său (prof. Van Montagu, Universitatea din Gand, Belgia) calitatea de pionier al transgenezei vegetale în Europa.

O altă bacterie transgenică ce merită sa fie menționată este *Pseudomonas syringae*, întrucât a fost primul OMG diseminat în mod voluntar în mediul înconjurător (în SUA, în anii 1983-1984), fără a se lua în considerare eventualele riscuri ecologice. Obținerea unor produse farmaceutice, prin utilizarea unor microorganisme, a început odată cu izolarea gramicidinei (de către R. Dubos, in 1939) dintr-o bacterie edafică (din sol), *Bacillus brevis*, care „hrănită" cu pneumococi, stafilococi şi streptococi s-a dovedit a avea capacitatea sa "digere" aceşti agenți patogeni. Perioada 1980-1990 reprezintă etapa primelor tentative, mai întâi în SUA, apoi şi în Europa, pentru aplicarea transgenezei în **terapiile umane**, fie pentru a lupta împotriva unor **boli genetice** (mucoviscidoză, miopatia Duchenne), fie împotriva diverselor tipuri de cancer. Premiera mondiala pentru cultura experimentală, în câmp, a unei plante transgenice a fost în Belgia, in anul 1986. Începând cu acest moment se constată extinderea parcelelor experimentale şi creşterea numărului speciilor de plante transgenice aproape peste tot în lume. Comercializarea primelor plante modificate genetic începe în SUA în anul 1994, în 1996 încep transporturile de containere cu soia şi porumb transgenic din SUA către diferite porturi ale Europei; explozia de culturi comerciale cu plante transgenice în SUA, Canada şi Argentina.

4. OMG in regnul vegetal

Transformarea genetică a plantelor a cunoscut un progres spectaculos, de la obținerea primelor gene himere, în anii 1970, la generarea primelor plante transformate genetic purtând gene străine (Gasser şi Fraley, 1989), metodele utilizate pentru transformarea celulei vegetale, relevarea importanței genelor marker şi raportoare, progresul înregistrat în introgresia în genomul vegetal a unor gene cu importanță economică si date recente raportate în literatura acestui domeniu al geneticii actuale.

În anii 1990 s-a ajuns la eliberarea în câmp şi cultivarea pe scară largă a plantelor transgenice, de la 1,7 ha în anul 1996 la 39,9 milioane ha în anul 1999 si probabil circa 100 milioane ha in prezent. Metodele utilizate pentru transferul eficace al alogenelor în organisme vegetale receptoare au cunoscut, de asemenea, un progres nu mai puțin spectaculos, de la metode simple până la adevărate metode agresive de "împuşcare" directă a ADN în țesuturile țintă. Odată cu dezvoltarea metodologiei de izolare şi clonare a genelor, respectiv a metodelor de transfer în celulele vegetale, un număr tot mai mare de plante au fost supuse transgenezei, incluzând grupe cu mare importanță economică: cereale, leguminoase, solanacee, specii pomicole si forestiere. În literatura de specialitate s-au publicat o serie de sinteze si cărți referitoare la transformarea genetică a plantelor (Davey şi colab., 1989; Potrykus, 1991; Songstad şi colab., 1995; Potrykus şi Spangenberg, 1995).

Descoperirea structurii de dublu helix a ADN-ului uman de către Watson şi Crick la începutul anilor 1950 a dus la cunoaşterea fundamentului biologic al speciei umane dar şi a altor specii, iar dezvoltarea bio-tehnologiilor a făcut posibilă intervenția în genom în cadrul tehnicilor de inginerie genetică. Aplicarea acestor tehnici la plante a făcut posibilă obținerea unor

BCU ALUMNI LIBRARY

specimene modificate genetic. Odată cu începutul anilor '70, o serie de tehnici ale inginerie genetică (manipularea directă a genelor de către om) permit extragerea unei gene din genomul unui organism şi reimplantarea ei în genomul unui alt organism, aparţinând unei alte specii din acelasi regn sau chiar din alt regn. Acest transfer de gene este numit **transgeneză**, pentru că el presupune traversarea barierelor care, până nu demult, împiedicau schimburile de gene între specii diferite, mai ales între cele aparţinând unor regnuri diferite.

Gena care codifică un caracter pe care dorim să-l transferăm unui alt organism se numeşte genă de interes, devenită în momentul transferului efectiv transgenă, iar organismul receptor va fi numit **organism transgenic**. Ingineria genetica permite in prezent chiar crearea unor gene artificiale sau modificarea patrimoniului genetic al unei specii, prin inactivarea, modificarea sau prin adăugarea (adiţia) uneia din propriile sale gene. Sigla OMG desemnează, orice organism al cărui patrimoniu genetic a fost modificat prin mecanisme specifice ingineriei genetice. Practic, obţinerea unui OMG implică cinci etape principale:

1. Identificarea şi pregătirea (multiplicarea) genei de interes;
2. Introducerea ei, prin diverşi vectori, în celula gazdă;
3. Selectarea celulelor gazdă care au integrat transgena în genomul lor;
4. Obţinerea, în cazul organismelor pluricelulare, a unui nou organism pornind de la o singură celulă transgenizată;
5. Verificarea transmiterii ereditare a caracterului codat de transgenă, la descendenţii organismului transgenic.

Organismele modificate genetic, create şi cultivate pe scară largă în Statele Unite ale Americii, sunt acceptate de guvernele unor ţări ale lumii, care merg până la a le prezenta drept o rezolvare a problemei foametei; dar sunt privite cu neîncredere de numeroase alte ţări şi respinse cu vehemenţă de organizaţiile ecologiste, devenind astfel un subiect controversat. Unii specialişti chiar au ajuns să definească organismele modificate genetic ca o "soluţie periculoasă la o problemă inexistentă". Progresele realizate în ultimii ani în ştiinţă şi în tehnologie au avut un impact puternic asupra sectorului agricol, alimentar şi implicit asupra celui farmaceutic din întreaga lume.

Plantele transgenice şi noile lor proprietăţi Sunt relativ puţine lucrări care abordează, în mod critic, problema metodelor utilizate pentru transformarea genetică a plantelor (Potrykus, 1991), respectiv a mecanismelor biologice care permit transferul şi integrarea unui fragment de ADN străin într-o celulă vegetală ţintă.

Metode de modificare a celulelor vegetale

Metode indirecte de transformare a plantelor.

Transformarea mediată de bacterii. Bacteriile din sol, *Agrobacterium tumefaciens* şi *Agrobacterium rhizogenes* realizează ceea ce s-a numit "inginerie genetică naturală". Aceaste bacterii sunt capabile să transfere în ţesutul vegetal lezat, un fragment de ADN propriu, ADN-T, de pe plasmida Ti (tumor inducing) în cazul speciei *A. tumefaciens* – sau Ri (root inducing) în cazul speciei *A. rhizogenes*, care se integrează în genomul plantei.

Transformarea mediată de virusuri Utilizarea vectorilor virali pentru transformarea plantelor, în ciuda numeroaselor eforturi experimentale, nu a adus rezultate spectaculoase. Deşi, în 1984 a fost posibil transferul unei gene de rezistenţa la antibiotic cu ajutorul unui virus ADN (Brisson şi colab., 1984), cercetările ulterioare au demonstrat că genomul viral nu poate accepta şi transfera fragmente mai lungi de ADN străin. Descoperirea faptului că virusurile ARN pot genera ADNc prin transcripţie inversă a generat sperenţa că, mult mai numeroasele virusuri ARN ar putea fi utilizate ca vectori de gene pentru celula vegetală. Din păcate, însă, s-au întâmpinat alte dificultăţi. ADNc viral nu se integrează în genomul vegetal iar meristemele, principala sursă de celule totipotente, nu sunt infectate de virusuri. De aceea, vectorii virali sunt mai rar utilizaţi în experimentele de transformare genetică a plantelor.

Metode directe de transformare a plantelor

Utilizarea protoplastelor pentru transferul direct de ADN Protoplastele, celule vegetale lipsite de perete celular, reprezintă limita de expresie a totipotențialității. De la primele plante de tutun regenerate din protoplaste izolate (Takebe şi colab., 1971) până astăzi numărul plantelor pentru care regenerarea din protoplaste a devenit posibilă a crescut permanent, ajungând la peste 400 de specii de plante. Tesuturile derivate din protoplaste au în general origine clonală provenind din celule individuale. Eficiența selecției transformanților este, prin urmare, maximă în cazul protoplastelor deoarece se evită formarea de himere, destul de frecvente la nivelul sistemelor multicelulare. Pentru transferul ADN, de obicei plasmidial, în protoplastele izolate se pot utiliza diferite metode:

- **Tratamente chimice cu agenți permeabilizanți**, de exemplu polietilenglicol (PEG):

- **Electroporarea,** formarea de micropori sub efectul curentului electric;

- **Ultrasonarea,** transferarea sub efectul undelor ultrasonice;

- **Microinjectarea** constă în introducerea cu ajutorul unei micropipete a ADN direct în protoplaste, acestea fiind fixate cu o altă micropipetă;

- **Fuziunea cu lipozomi** consta in fuziunea lipozomilor încărcați cu ADN cu membrana plasmatică a protoplastelor şi eliberarea ADN străin în citoplasmă;

- **Metoda "biolistică" – împuşcarea directă a ADN în celule** Metoda biolistică (biolostics) sau "particle gun", de împuşcare directă a ADN în țesuturi țintă (Klein şi colab., 1987), este cea mai spectaculoasă metodă de transformare genetică a plantelor, care a declanşat un val de entuziasm în rândul specialiştilor din acest domeniu. In dezvoltarea acestei tehnici s-a investit foarte mult efort şi bani dar şi rezultatele obținute au fost pe măsura aşteptărilor. Metoda constă în accelerarea unor particule foarte mici (1μm diametru) din tungsten sau aur coloidal, pe care a fost precipitat ADN, în țesuturi vegetale țintă. Această tehnică are numeroase avantaje care o recomandă pentru aplicabilitate generală: este o metodă uşor de aplicat, printr-o împuşcătură pot fi țintite mai multe celule, celulele supraviețuiesc după împuşcare, genele purtate de particule îşi păstrează activitatea biologică, particulele pot fi împuşcate în stratele superficiale sau în profunzimea unui organ vegetal, celulele țintă pot fi foarte diferite: polen, celule în suspensie, embrioni imaturi, celule din țesuturi diferențiate sau chiar meristeme. Datorită avantajelor sale biolisticul a devenit metoda favorită în numeroase laboratoare, permițând transformarea cu succes a unor plante pentru care alte metode nu au dat rezultate cum ar fi: soia, porumbul, ovăzul, orezul, sorgul, trestia de zahăr, grâul, plante forestiere etc. O aplicație aparte a fost utilizarea împuşcării de microproiectile pentru rănirea apexurilor la floarea soarelui, eficientizând astfel transformarea mediată de *Agrobacterium tumefaciens* (Bidney şi colab., 1992). Mai mult, s-a reuşit împuşcarea directă în țesuturi vegetale a celulelor bacteriene întregi.
- **Electroforeza** Migrarea ADN printr-un țesut vegetal viu, ca țintă;

- **Utilizarea fibrelor de carbură de siliciu** (silicon carbide technology) Fibrele de carbură de siliciu se utilizează în industrie. Transformarea genetică prin această tehnologie este relativ simplă, constând în vortexarea (agitarea) țesuturilor împreună cu ADN şi fibre de carbură de siliciu. Astfel, fibrele penetrează pereții celulari permițând ADN să pătrundă în citoplasmă. Metoda a fost aplicată inițial transformării embrionilor de insecte, iar ulterior s-a dovedit eficientă şi în transformarea celulelor vegetale (Kaeppler şi colab., 1990). Cercetările de microscopie electronică au relevat penetrarea peretelui celular de către astfel de fibre, sugerând

BUCHAREST PHARMACEUTICAL UNIVERSITY LIBRARY

că ADN aderă de suprafața fibrelor și este introdus odată cu acestea în celulă. Având proprietăți fizice asemănătoare azbestului fibrele de carbură de siliciu sunt probabil carcinogene.

Gene transferate

Genele marker și genele raportoare – importanța lor pentru cercetările de genetică vegetală. Alogenele sunt introduse experimental în plante cu scopul de a obține proprietăți noi sau a altera caracterele acestora. In cazul plantelor, din păcate, eficiența transformării stabile este scăzută, doar o parte din celulele expuse ADN integrează genele străine, iar dintre aceste numai celulele totipotente regenerează clone transformate. De aceea, este nevoie de sisteme de selecție foarte eficiente. In acest scop se folosesc gene marker sau chiar compuși fitotoxici. Genele marker sunt acele gene care permit selecția celulelor care le poartă, iar genele raportoare sunt gene care codifică proteine ușor de evidențiat în celule sau extracte celulare. Unele gene pot fi considerate atât gene marker cât și raportoare. In general ca gene marker se utilizează gene care conferă rezistență la antibiotice sau erbicide, dar mai recent s-au dezvoltat și metode de selecție pozitivă utilizând gene bacteriene ce permit metabolizarea unui anumit substrat, de exemplu manoză sau xiloză (Joersbo și Okkels, 1996). Dintre genele marker cel mai mult a fost utilizată gena nptII, sau neo, genă izolată din transpozonul Tn5 de la *Escherichia coli K12*. Această genă codifică neomicinfosfotransferaza, enzima implicată în detoxificarea unor antibiotice aminoglicozidice cum ar fi: neomicina, kanamicina, paramomicina sau gentamicina.

Gene de selecție Gena marker de selecție la: kanamicină, neomicină, geneticină (GA18) nptII (APH3´II) neomicinfosfotransferaza II, gentamicină aacC3, aacC4 gentamicin-3-N-acetiltransferaza, higromicină hph, hpt (APH4) higromicin-fosfotransferaza, metotrexat dhfr dihidrofolatreductaza, spectinomicină ADNr16S, aadA ARNr 16S aminoglicozidă-3'adeniltransferaza, streptomicină SPT, ADNr 16S aadA streptomicinfosfotransferaza ARNr 16S aminoglicozidă-3'-adeniltransferaza, bleomicină, fleomicină ble, blasticidină bsr blasticidin S deaminaza, sulfonamidă sul dihidropteratsintaza, fosfinotricină bar fosfinotricinacetiltransferaza, clorsulfuron als, csr-1 acetolactatsintetază, bromoxinil bxn bromoxinilnitrilaza, glifozat EPSPS 5-enolpiruvil-3-fosfatsintetaza, 2,4-D tfdA 2,4-diclorfenoxiacetat monooxigenaza, atrazină psbA proteina QB, 2,2-DCPA dehalogenaza 4-metil-triptofan tdc triptofandecarboxilaza, nitrat NR nitratreductaza, S-amonoetil-L-cisteină DHPS dihidropicolinatsintetaza, lizină/treonină AK aspartatchinaza aminoetil-cisteină ocs octopinsintetaza, O altă genă marker este gena dhfr pentru enzima dihidrofolatreductază (DHFR), izolată tot de la *E. coli* de pe plasmida R67. Enzima DHFR conferă rezistența la un analog al acidului folic, metotrexat, celulele vegetale fiind extrem de sensibile la concentrații mici ale acestui compus (Schrott, 1995). Gena dhfr a fost transferată la specii cum ar fi: tutunul, petunia și grâul.

Gene raportoare, spre deosebire de markerii de selecție nu conferă celulelor rezistență față de un anumit compus. Ele codifică proteine care pot fi detectate direct sau catalizează reacții specifice ai căror produși pot fi detectați prin metode relativ simple. Genele raportoare permit studiul factorilor de transcripție cis sau trans, în condițiile transformării tranziente sau permanente, precum și monitorizarea și optimizarea tehnologiei de transformare.

Transferul indirect. Se cunoaște faptul că bacteria *Agrobacterium tumefaciens* se găsește și în sol și poate pătrunde în rădăcinile plantelor prin intermediul unor mici răni. La speciile sensibile poate provoca o proliferare exagerată a celulelor și apariția unor tumori, situate mai ales la nivelul coletului. Această proliferare este dată de pătrunderea plasmidului bacterian (Ti= tumor inducing) și inserției ADN-ului plasmidial ancogen în genomul vegetal. Înlocuind gena oncogenă printr-o genă străină (genă bacteriană ce codifică **rezistența la un antibiotic**), echipa Profesorului M.Van Montagu (Universitatea din Gand, Belgia) a obținut astfel de bacterii

transgenice lipsite de puterea oncogenă, dar capabile totuşi de introducerea ADN-ului lor plasmidial în genomul vegetal. Realizând o cultură mixtă de bacterii transgenice şi celule de tutun, cercetătorii belgieni obţinuseră, în 1983, prima plantă transgenică: un tutun rezistent la ampicilină. Chiar lipsit de interes agricol, acest tutun obţinut a confirmat validitatea transgenezei, via *Agrobacterium tumefaciens*, şi a făcut din echipa belgiană liderul incontestabil al plantelor transgenetice în Europa.

Transferul direct. Deoarece transferul indirect nu reuşeşte decât rareori la monocotiledonate (insensibile la infecţia cu *Agrobacterium*) şi procesul este asemănător şi în cazul soiei (la care *Rhizobium* produce cunoscutele nodozităţi pe rădăcini), cercetătorii au fost nevoiţi să apeleze şi la metode directe pentru transferul genelor de interes. Spre exemplu, pentru porumb, matoda cea mai utilizata este cea de tip biolistic: microbile de tungsten, de aur sau de platină învelite cu genele de interes sunt proiectate spre celulele gazdă cu ajutorul unor „tunuri de gene" microproiectilele trebuie să fie suficient de mici pentru a nu distruge definitiv celula gazdă, dar, în acelaşi timp, cu suficienă energie cinetică spre a traversa pereţii celulelor şi membranelor citoplasmatice. Tehnicile actuale nu permit încă un control exact al localizării fixării transgenelor în genomul celulei gazdă. Inserţia unei gene străine ar putea să întrerupă secvenţele unei gene endogene, să perturbe expresia altor gene endogene şi, astfel, să provoace modificări metabolice şi efecte secundare nedorite.

Selectarea celulelor gazdă purtătoare ale genei de interes. Oricare ar fi metoda de transfer, rata reuşitei este întotdeauna foarte mică, de aceea este necesară asocierea la gena de interes şi a unei gene marker (care codifică rezistenţa la un antibiotic sau ierbicid), care favorizează selectarea celulelor în care s-a integrat transgena.

Regenerarea plantelor transgenice şi cultura în spaţii protejate. Plantele transgenice trebuiesc trecute din cultura in vivo în sere sau în camere climatizate. Acest procedeu trebuie repetat de-a lungul mai multor generaţii pentru a se controla expresia noului caracter (o genă poate fi prezentă în genomul unui organism fără însă a se exprima fenotipic), transmiterea sa ereditară şi absenţa efectelor nedorite.

Cultura experimentală în aer liber/în câmp (se evita folosirea termenului "in natura") Scopul principal al acestei culturi realizate pe parcele de dimensiuni mici este acela al testării comportamentului noii plante transgenice la cultura în condiţii naturale; un alt scop este cel al încrucişarii plantei transgenice cu varietatea sau soiul convenţional de tip elită, pentru obţinerea de organisme modificate genetic cu un randament productiv cât mai apropiat de varietăţile convenţionale corespunzatoare. Dar, aceste operaţii de încrucişări-selecţionări pot dura mai mulţi ani, motiv pentru care anumiţi producători de seminţe OMG stabilesc culturi experimentale în ambele emisfere, beneficiind astfel de două oerioade de vegetaţie pe an. Teoretic, aceste culturi experimentale ar trebui să evalueze şi impactul OMG-urilor asupra mediului înconjurător şi asupra sănătăţii oamenilor. Entuziasmul suscitat de aplicaţiile potenţiale ale transgenezei vegetale era extraordinar printre pionierii noii biotehnologii. Van Mellaert (1999, Universitatea din Gand, Belgia), spunea: „...trăiam într-un fel de vis. Eram convinşi că biotehnologiile umane aveau să schimbe totul şi că ele vor constitui soluţia tuturor problemelor. Noi trăiam într-o fază de exaltare, aveam într-adevăr dorinţa de a porni maşina şi de a găsi finanţarea pentru ca aceasta să meargă". Explozia cercetărilor şi experienţelor în acest domeniu, interesul investitorilor în susţinerea acestor studii, precum şi arealul pe care s-au extins l-au îndreptăţit pe profesorul Garcia Olmedo (Universitatea din Madrid), care a lucrat cu o echipă belgiană, să vorbească despre „a treia revoluţie verde" (Garcia Olmedo, 1998). În SUA entuziasmul a fost cel mai mare: giganţi ai chimiei, ai agrochimiei şi ai **industriei farmaceutice** doreau să investească masiv în producerea de seminţe transgenice. Tehnicile transgenezei urmau

să permită crearea de plante care necesită mai puține îngrășăminte azotate grație transferului genelor Nif (prezente doar la unele eucariote); prin aceste tehnici se vor putea creea plante rezistente la condițiile de stres ambiental (aciditatea sau salinitatea solurilor, înghețul, seceta etc.) și care limitează dezvoltarea agiculturii în anumite regiuni ale globului; tot prin aceste tehnici se vor putea obține plante rezistente la boli și la insectele dăunătoare, plante mai ușor de prelucrat pe cale industrială etc.

Progrese recente în transferul unor gene cu importanță economică De la cercetările fundamentale bazate pe utilizarea markerilor de selecție sau a genelor raportoare s-a trecut treptat la utilizarea unor gene cu importanță economică. Cateva exemple de plante transgenice purtand gene cu importanță economică mare: Tomate FLAVR SAVR gena antisens pentru poligalacturonaza, Garoafe cu viață prelungită in vază modificarea metabolismului etilenei, Garoafe mov "Moondust", "Moonshadow", Petunii portocali (purtand gena dfr de la porumb, Plante rezistente la erbicide, Plante rezistente la insecte (gena pentru endotoxina Bt), Plante rezistente la virusuri cu gene pentru "coat protein", Modificări ale metaboliților primari (Proteine, Uleiuri, Amidon, Vitamina A ("golden rice"), vitamina E, Plante bioreactoare (vaccinuri, anticorpi, proteine din lapte uman, proteina din fibra pânzei de paianjen), Fitoremediere – plante rezistente sau care acumulează agenți poluanți etc. Astfel, în prima generație de plante transformate genetic testate în cultura în câmp, sunt incluse plantele rezistente la erbicide, la insecte și virusuri.

Generațiile următoare de plante transgenice cuprind plante având modificate căile metabolice – plante mai bogate în **provitamina A** sau **provitamina E** sau îmbogățite în **fier** – orezul auriu („golden rice"), plante având uleiuri de calitate superioară pentru consumul uman sau uleiuri noi pentru uz industrial, plante care produc noi hidrocarburi sau combustibili (soia pentru biodiesel), **amidon** de calitate mai bună, **proteine îmbunătățite sau proteine noi** – de exemplu o **proteină cu efect inhibitor** asupra bacteriilor care produc **carii dentare** (cum este *Streptococcus mutans*), **vaccinuri sau proteine de uz terapeutic**, noi strategii pentru a obține plante rezistente la boli virale, fungice sau bacteriene sau rezistente față de nematode, plante rezistente la uscăciune și extreme termice, plante ornamentale având culoarea, mirosul sau habitusul modificat și altele (Herbes și Sonnewald, 1999). Progresul cercetărilor în acest domeniu este atât de rapid încât o prezentare exaustivă este aproape imposibil de realizat. Deși realizările sunt extraordinare iar perspectivele de aplicare pe scară largă ar rezolva multe probleme de producție și calitate a produselor agricole pentru viitorul apropiat și îndepărtat, se înregistrează astăzi, din păcate, o criză în domeniul aplicării biotehnologiilor vegetale cauzată de percepția publică și actvitatea unor organizații ecologiste. Problemele etice pe care le ridică aplicarea noilor biotehnologii trebuie analizate și rezolvate cu multă chibzuință și deschidere fără a frâna progresul din acest promițător domeniu al geneticii (Rakosy-Tican, 1998). Printre proprietățile noi ale plantelor testate în culturi experimentale precedând primele culturi comerciale, amintim: Rezistența la ierbicide, Rezistența la insecte dăunătoare, Rezistența la boli, Maturarea întârziată, Rezistența la îngheț s.a.

Chiar dacă organismele modificate genetic rezistente la îngheț nu se cultivă pe scară largă vom menționa două dintre strategiile utilizate pentru a le oferi această proprietate. Tratamentul culturilor de soiuri convenționale (mai ales a căpșunilor), prin pulvarizarea cu bacterii transgenice „antigel", pentru protejarea acestora de înghețurile târzii. Inserția unor gene provenind de la peștii din apele reci, spre exemplu o genă de la *Hippoglossus hippoglossus* (pește pleuronectid din Marea Nordului) transferată la căpșuni, situație descrisă foarte bine de Apoteker (1999) în celebra sa lucrare „ Du poisson dans les fraises".

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Avantajele plantelor transgenice, prezentate de producătorii şi apărătorii lor sunt pentru amelioratori, agricultori, industriaşi (inclusiv farmacisti), consumatori, mediul înconjurător şi pentru viitorul umanităţii.

OMG in regnul animal – animale transgenice

Proprietăţile animalelor transgenice. Primele experienţe în vederea obţinerii de animale transgenice au fost realizate de R. Palmiter şi R. Brinster (1982), cercetători americani(de la Universităţile din Seattle, Philadelphia şi San Diego) care au reuşit transferul genei **hormonului de creştere** (somatotropina) de la şobolan la şoarece. Gena respectivă a fost prima oară clonată în bacterii pentru obţinerea ei în cantităţi mari. Este vorba de un şoarece gigant, de două-trei ori mai mare decât cel normal, caracter generat prin transferarea în genomul său a genei ce codifică hormonul de creştere la şobolan. Pentru a obţine şoareci transgenici se foloseşte de obicei următoarea tehnică: ovulele sunt prelevate de la o femelă matură şi fecundate cu spermă in vitro. După aceea un plasmid recombinat, care posedă o genă ce poate fi relativ uşor identificată, este introdus prin microinjecţie cu un tub fin de sticlă în pronicleul mascul al ovulului proaspît fecundat, înainte ca nucleele haploide ale spermatozoizilor şi ovulelor să fuzioneze pentru formarea nucleului diploid al zigotului. Plasmidele circulare se recombină de obicei pentru a forma o structură lungă în tandem concatemer, care se poate integra probalistic pentru a forma o structură alcătuită din gene repetate în tandem, incluse într-un singur locus cromozomial. După aceea are loc implantarea zigotului respectiv într-o femelă, care va da naştere unor animale transgenice. Ulterior se realizează un proces de selecţie în vederea obţinerii unei linii de şoareci care să posede gena transferată atât în linia germinală, cât şi în cea somatică. Prin astfel de microinjecţii s-a reuşit transferul genei hormonului de creştere de la şobolan la şoarece, genă ataşată de un promotor puternic al genei metalothioneinei. Această genă codifică proteina metalothioneină care are rolul de a transporta în organism metale grele toxice, precum zincul şi cuprul. Şoarecii care prezentau 35 de copii ale genei hormonului de creştere aveau un ritm de creştere mult mai rapid ca cel al şoarecilor normali. În experienţele lui R. Palmiter şi R. Brinster s-a observat că cca 1/3 dintre şoarecii manipulaţi genetic au integrat gena exogenă şi au avut la vârsta de trei luni o talie dublă faţă de cea normală. Acest şoarece a inspirat specialiştii din zootehnie, care au văzut în astfel de transgeneză un mijloc de a spori performanţele productive.

După câţiva ani, un alt veritabil entuziasm s-a instaurat pentru animalele transgenice producătoare de **medicamente**, mai ales în anumite societăţi gigante din domeniul **industriei farmaceutice**, provocând apariţia de noi întreprinderi „start-up" şi atrăgând investitori care au mizat în mod generos pe aceste animale.

La vertebratele inferioare (peşi, amfibieni) s-au obţinut rezultate bune prin injectarea ADN în citoplasmă şi nu în nucleu, ca la mamifere. Aceasta din cauză că enzimele care distrug ADN sunt mai puţin active la vertebratele inferioare. ADN-ul injectat este replicat foarte rapid în citoplasmă de zece până la cincizeci de ori. La Jouy-en-Josas, în Franţa, s-au făcut astfel de injectări la păstăv cu gena hormonului de creştere uman sau de şobolan. S-a constatat că cca 20% dintre ovulele injectate erau transgenice, iar animalele obţinute aveau un ritm de creştere mai intens. La porcii transgenici cu gena hormonului de creştere s-a constatat o creştere mai rapidă şi o producţie de carne mai fragedă, cu valoare comercială mai bună, iar animalul are capacitatea de a valorifica mai bine furajele. Totuşi s-a observat că animalele transgenice prezintă unele dificultăţi fiziologice din cauză că produc hormonul de creştere permanent, în timp ce în mod normal hormonul este produs doar în primele luni de viaţă.

În Australia au început experienţe pentru transferul la oi a două **gene bacteriene** care determină **transformarea serinei într-un alt aminoacid, cisteina**. Acest ultim aminoacid aste un factor limitant al producţiei de lână la oi. În acelaşi scop se preconizează transferul keratinei, care este o proteină majoră a lânii la oi. În mod clasic, tehnica obţinerii unui animal transgenic presupune microinjectarea unei soluţii conţinând numeroase **copii ale genei de interes** într-un ovocit, imediat după fecundarea sa, ca şi transferul celulei ou în oviductul sau uterul unei femele

receptive. Deşi principiul metodei este foarte simplu, ea necesită multe încercări, deoarece rata reuşitei este foarte scăzută: între 10 şi 25% pentru formarea embrionilor şi între 1-5%, pentru obţinerea indivizilor. Recenta asociere a tehnicilor de transgeneză şi de clonaj reproductiv, teoretic ar trebui de acum înainte să facilitaze obţinerea de animale transgenice omogene sub aspect genetic. Domeniile de aplicare a transgenezei animale sunt foarte diversificate deoarece ele privesc deopotrivă cercetarea în biologie şi medicină, în **farmacologie** şi agricultură.

a) **Animale transgenice ca modele experimentale.**

Ca şi înaintea „erei transgenice", şoarecele reprezintă şi acum animalul favorit pentru experimentatori. Mii de mutante transgenice au fost create pentru studierea funcţiilor genelor şi reglarea expresiei lor. Una din experienţele cele mai spectaculoase a fost crearea unui şoarece verde –luminescent, realizare a cercetătorilor japonezi, care au transferat gena responsabilă pentru bioluminescenţă (GFP= green fluorescent protein) **de la o meduză la un şoarece.** Utilizată ca şi marker, această genă permite observarea cu ochiul liber şi în întuneric, a prezenţei unei transgene de interes. Tot în Japonia, recet s-a reuşit **integrarea în genomul unui şoarece a întregului cromozom 2 uman**, care joacă rol important în **sistemul imunitar**. Acest şoarece nou sintetizează atât anticorpi de şoarece, cât şi **anticorpi umani**, constituind un excelent model experimental. De altfel, se considera ca Japonia ar fi realizat inca dela sfarsitul secolului XX armele biologice ale celei de a doua jumatati a secolului XXI, bazate nu pe bacterii, virusuri si toxine ci pe ingineria genetica a genomului uman. Sa nu uitam ca in cel de Al Doilea Razboi Mondial armata japoneza a folosit si arme biologice "clasice" motiv pentru care microbiologii implicati au fost judecati de invingatori ca fiind criminali de razboi (procesul de la Habarovsk).

Inhibând anumite gene, o serie de cercetători spanioli au obţinut un şoarece rezistent la cancerul de piele, iar cei italieni au creat şoarecele „Mathusalem", a cărui speranţa de viată este cu 30% mai mare decât normalul.

Tehnicile transgenezei sunt utilizate si pentru provocarea la şoareci a unor **boli umane** fie pentru a fi studiate, fie pentru a se stabili tratamente ori vaccinuri adecvate. Aşa, spre exemplu, in ultimul deceniu, mii de exemplare din celebrul „oncomouse" american (obţinut în 1998 la Universitatea Harvard) şi care poartă o genă producătoare de cancer, sunt utilizate în numeroase laboratoare de oncologie experimentală. O serie întreagă de experienţe şi cercetări sunt pe cale de a crea şoareci transgenici cu boli umane, de tip genetic sau nu. În SUA există deja constituită o bancă pentru conservarea tuturor liniilor de şoareci transgenici, iar în Europa existe din 1999 o instituţie similară, European Mouse Mutant Archive, dar care nu este încă funcţională.

b) **Animale transgenice producătoare proteine farmaceutice**

Gene umane au fost transferate în **genomul animalelor domestice** în scopul obţinerii în fluidele lor biologice (în special în lapte) **sintetizarea de proteine umane de interes terapeutic**. Aceste cercetări sunt, în cea mai mare parte, efectuate de un număr mic de întreprinderi, specializate în obţinerea de **animale transgenice producătoare de medicamente**. Miza economică fiind enormă şi competiţia între echipele de cercetare extrem de accentuată, se înţelege de ce astfel de cercetări se realizează în cel mai mare secret. Rezultatele fac, adesea, obiectul unor declaraţii ale purtătorilor de cuvânt din aceste întreprinderi înainte ca ele să fie publicate în revistele ştiinţifice şi ele sunt, oricum, protejate prin brevete. Se fac şi s-au făcut cercetări pentru a obţine animale trangenice (oi, vaci) care să secrete în lapte cantităţi mari din proteina dorită, care să poată fi recoltată din lapte. De regulă laptele conţine niveluri ridicate de proteine precum cazeina, β-lactoglobulina etc. Producţia acestora este limitată de funcţionarea genelor respective numai în celulele glandei mamare. Animalele transgenice pot servi ca nişte **bioreactoare care produc continuu proteina dorită în lapte**.

Printre **proteinele cu importanţă farmaceutică** produse pe această cale sunt **Factorul IX, interleukina-2, activatorul plasminogenului tisular** (tPA), **urokinaza** si altele. Pentru a transfera în ţesuturi gena **activatorului plasminogenului** implicată în dizolvarea cheagurilor de sânge la om şi activă numai în ţesutul mamar, aceasta este plasată sub controlul unui promotor al β-lactoglobulinei. Prin microinjecţii, gena respectivă a fost introdusă în ovule fecundate de

oaie, care apoi au fost implantate în femele, iar animalele transgenice au fost identificate. S-a constatat că animalele transgenice secretă această proteină în lapte, de unde poate fi apoi purificată. Exemple de descoperiri relativ recente: oi al căror lapte conține AAT (**ά 1-anti-tripsină**), folosită pentru tratarea anumitor boli ale aparatului respirator ori **factorul IX**, în lipsa căruia apare hemofilia B; capre în al căror lapte se întâlnește fie **anti-trombina III**, un anticoagulant, fie **anticorpi anti-cancerigeni**; vaci care produc în lapte **proteina GAD**, folosită pentru combaterea diabetului, **ά-lactalbumine** destinate noilor născuți prematur și incapabili sa se hrănească, **lactoferină**, cu rol în stimularea sistemului imunitar la om, vaci a căror **lapte este sărac în β-lactoglobuline și în lactoză**, produse care nu sunt tolerate de anumite persoane.

c) **Animale transgenice donatoare de organe**.

Datorită dimensiunilor si metabolismului lor, **organele de porc** sunt considerate ca fiind cele mai adaptate pentru a putea fi folosite la om. Deja se practica grefe de valve cardiace dela porc mistret. Obținerea prin „adăugarea" de gene umane deschide un drum nou pentru **xenogrefe**: ficat, inimă și pancreas de „porci umanizați" vor fi mult mai compatibile cu corpul uman. Dar problema serioasă pusă de aceste xenogrefe constă în faptul că organele de animale conțin uneori de virusuri care sunt tolerate de animale, dar sunt patogene sau chiar mortale la om.

d) **Animale rezistente la infecții virale**.

Pentru protecția animalelor domestice față de infecțiile virale se transferă gene care determină **sinteza proteinelor capsidei virale**. Astfel s-a transferat gena env care codifică o glicoproteină a învelișului exterior al *virusului leucozei aviare*. S-a realizat o infecție a ouălelor fecundate cu ADN provenit de la un retrovirus recombinat. S-au obținut astfel găini transgenice, fiecare conținând provirusul ADN al virusului leucozei aviare integrat în diferite poziții în genom. Majoritatea găinilor transgenice prezentau infecții virale și simptome ale virozei ALV. O linie de găini transgenice nu a prezentat infecții virale, din cauza unor mutații în provirusul ADN. Teste imunologice au arătat că această linie linie prezenta numai **proteina anvelopei virale**, aceste găini fiind rezistente la infecția virală. Mecanismul rezistenței este următorul: proteina anvelopei virale se cuplează cu receptorul celular al ALV, blocând infecția virală a celulei.

S-au mai obținut vaci transgenice care produc **β-interferon**, o citokină care stimulează rezistența la atacul viral, de pildă în cazul enterovirusului care provoacă diareea animalelor.

e) **Tehnologia ADN-ului recombinat în genetica umană**

Clonajul reproductiv este o tehnică ce permite conceptia unui organism nou, fără a face apel la reproducerea sexuată. Individul clonat se naște dintru-un ovocit enucleat și nucleul unei celule somatice, parcurgand sase etape:

-Extragerea nucleului dintr-un ovocit matur;
-Activarea electrică a acestui ovocit;
-Punerea în contact a acestui ovocit cu celula somatică;
-Fuzionarea celor două celule prin aplicarea de descărcări electrice;
-Cultivarea zigotului in vivo (în oviductul legat al unei femele, timp de 4-5 zile);
-Implantarea embrionului în uterul unei femele receptoare.

Primele colaje au fost realizate folosind drept celule somatice celulele embrionare foarte tinere, deci totipotente. Cercetările desfăsurate la Institutul Roslin Edinburgh (Scoția) au adus ameliorări spectaculoase acestor tehnici de colaj reproductiv. Prin tratamente adaptate, cercetătorii au reușit să restaureze totipotența unor celule pe cale de diferențiere (celule embrionare „bătrâne", celule fetale) și împotriva oricărei așteptări, chiar a unor celule specializate. Așa este cazul unor celule din glandele mamare ale unei oi gestante, care au permis clonarea oii Dolly (după 434 încercări de fuziune celulară nereușite). Animalele astfel obținute posedă același patrimoniu genetic, dar ele nu sunt copii exacte ale animalului clonat datorită rolului, încă puțin cunoscut, dar real, pe care il are citoplasma ovocitului în dezvoltarea embrionului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Elaborarea tehnologiei ADN recombinat în primii ani ai deceniului al şaptelea a făcut posibilă aplicarea sa şi în domeniul geneticii umane. Prima experienţă în acest sens a dus la sinteza **somatostatinei**, un peptid neurotransmiţător alcătuit din 14 aminoacizi. Gena somatostatinei a fost sintetizată artificial şi clonată într-un plasmid inclus în celule bacteriene de *Escherichia coli*, care în felul acesta produc peptidul neurotransmiţător.

În prezent, cu ajutorul tehnologiei ADN recombinat sunt produse proteine pentru tratamentul a numeroase boli: cancer, alergii, boli autoimune, dereglări imunologice, boli ale sângelui, diferite maladii genetice etc. Sinteza acestor proteine se realizează cu ajutorul unor celule bacteriene (*E.coli, Bacillus subtilis* etc.), celule de drojdii, culturi de celule de mamifere etc.

Primul medicament obţinut prin inginerie genetică este **insulina**, care în mod normal este produsă de un număr redus de celule din pancreas şi secretată în sânge. Incapacitatea de a produce insulină determină apariţia diabetului, astfel că sunt necesare injecţii zilnice cu insuluină. La mamifere se produce un preprohormon care conţine câţiva aminoacizi în plus, care este secretat prin membrana plasmatică. În timpul secreţiei, cu ajutorul proteazelor celulare sunt eliminaţi aminoacizii suplimentari şi moleculele de insulină mature sunt eliberate. Acestea sunt formate din două polipeptide scurte, A şi B, legate prin două legături disulfidice. Iniţial s-au realizat două gene separate pentru polipeptidele A şi B, care au fost inserate în gena β-galactozidazei de la β-galactozidazei, astfel că bacteria producea proteine de fuziune care conţineau secvenţele insuinei la capul enzimei β- galactozidazei. Prin purificare, aceste proteine mari erau obţinute din extractul bacterian şi erau eliberate prin tratare cu bromcian. Ulterior s-au reuşit obţinerea unei singure proteine de fuziune β- galactozidaza insulina. Gena a fost introdusă într-un vector şi inclusă în celule bacteriene de *E.coli*. Se produce astfel insulina care este deja comercializată de industria farmaceutică.

1) **Hormonul de creştere uman** este o proteină formată din 191 aminoacizi, produsă de glanda pituitară (hipofiza), cu rol în creşterea şi dezvoltarea organismului. Copiii născuţi cu mutaţii ale genei respective manifestă nanism hipofizar (raman pitici). Injecţii cu hormon determină dezvoltarea normală. Hormonul de origine animală este ineficient şi de aceea este necesară prezenţa proteinei hormon-uman care se poate obţine de la cadavre, cu toate inconvenientele care deriva de aici (infectios, juridic si cantitativ).

Hormonul de creştere uman (hGH), similar insulinei, este produs ca un precursor proteic mai mare, care conţine o secvenţă de aminoacizi suplimentară terminală. Gena hormonului de creştere a fost introdusă într-un vector şi transferată în celula bacteriană. Ca urmare, în celulele bacteriene s-au sintetizat molecule de hGN care s-au acumulat în spaţiul periplasmic, între membranele interne şi externe ale bacteriei, şi care sunt eliberate prin ruperea membranei exterioare prin hipotonie. Hormonul se foloseşte ca medicament pentru copii ce manifestă nanism.

În ultima vreme se fac cercetări pentru selecţia unui hormon de creştere uman cu o mai mare afinitate pentru receptor. Alterarea de acest gen necesită câteva schimbări de poziţie a unor aminoacizi. De pildă, pentru schimbarea a numai 3 aminoacizi sînt posibile 8.000 de combinaţii diferite, iar pentru a schimba 10 aminoacizi se pot realiza 1.013 combinaţii diferite. De aceea se foloseşte o tehnică nouă pentru selecţia acestor proteine cu schimbări utile în ce priveşte afinitatea pentru receptor.

Prin studiul structurii hGH şi a mutagenezei privind acest hormon, se cunoaşte ce secvenţă de aminoacizi este importantă pentru cuplarea cu receptorul. S-au sintetizat oligonucleotide ce codifică toţi aminoacizii posibili în această poziţie. S-a folosit fagul filamentos M13, care prezintă gena III ce codifică o proteină de mici dimensiuni a capsidei şi care se găseşte la suprafaţa fagului. Încorporarea oligonucleotidelor artificiale în această genă determină sinteza a numeroase variante ale proteinei capsidei virale, Tehnica "phage display". Această bibliotecă de mai mult de 10-11 fagi diferiţi în ce priveşte proteina de suprafaţă se trec într-o coloană care conţine hormonul receptor hGH. Fagii ce manifestă o capacitate de cuplare cu hormonul de creştere sunt separaţi. Selecţia se repetă de 6 ori, astfel că sunt izolate cu o mare afinitate pentru

receptor. Fagii obținuți sînt izolați și clonați. Printre variantele respective s-au selecționat unele cu o capacitate de fixare a receptorilor de 10 ori mai mare decât cele naturale.

2) **Vaccinul contra hepatitei B**. Vaccinurile obișnuite se bazează pe folosirea agenților infecțioși inactivați sau atenuați. Agenții respectivi prezintă proteine de suprafață (antigene) pentru limfocitele B și T, care în felul acesta reacționează rapid și distrug agentul infecțios înainte de a produce afecțiuni organismului. La aceste tipuri clasice de vaccinuri prezintă pericolul potențial de a infecta cu agenți infecțioși, astfel că, de pildă, copiii vaccinați contra poliomelitei pot contacta maladia prin intermediul vaccinului. Prin tehnologia ADN recombinat se produc exclusiv antigenele de suprafață la care răspunde sistemul imunologic al organismului. Ca urmare nu există riscul infecției.

Virusul hepatitei B (HBV) infectează celulele ficatului, le afectează și uneori produce cancer. Virusul conține un antigen de suprafață HbsAG, care se găsește în sângele bolnavului sub forma unor agregate proteice mari împreună cu genomul viral.

Virusul HBV are un genom de 3,2 kb care a fost secvențiat în totalitate. Gena HbsAG a fost clonată într-un vector-navetă cu capacitatea de replicare atât în celula bacteriană, cât și în cea de drojdie. Celulele de drojdie care conțin astfel de plasmide recombinate pot fi cultivate în bioreactoare, rezultatul fiind acumularea de cantități mari de proteine HBsAg, care după purificare agregă în particule de cca 20 nm diametru, asemănătoare celor care se găsesc în sângele bolnavilor. De asemenea, în ultima vreme se utilizează plasmide recombinate de la procariote și eucariote, precum și genomuri de tip mitocondrial și cloroplastic pentru transferul de gene în celulele de tip procariot și eucariot. Drojdiile transformate cu ajutorul acestor plasmide produc mari cantități de proteină virală (1-2% din totalul proteinelor drojdiei). Se pot produce astfel între 50 și 100 mg **proteină virală** per litru de mediu de cultură. Acest **vaccin este produs industrial și comercializat, el neprezentând pericolul infectării persoanelor vaccinate.**

Folosirea tehicii ADN recombinat a dus și la utilizarea celulei de mamifer pentru producția de **proteine cu importanță medicală**. Un prim medicament produs pe această cale a fost activatorul de plasminogen (tissue Plasminogen Activator=tPA), care este o enzimă (protează) care hidrolizează alte proteine. Este vorba de **fibrină**, proteină care formează cheagurile de sânge în cazul afecțiunilor cardiace. Administrarea rapidă a activatorului de plasminogen după un infarct miocardic dizolvă cheagurile de sânge care duc la modificări ireversibile ale mușchiului cardiac. Activatorul de plasminogen este produs prin transferul genei respective într-o linie celulară de mamifer, care poartă astfel un vector recombinat cu o mare capacitate de amplificare. Gena tPA a fost introdusă într-un vector viral transferat stabil într-o linie cu methotrexat și prin selecția celulelor în care gena era activă la nivel înalt, s-a reușit ca linia celulară respectivă să fie cultivată într-un mare bioreactor, iar proteina tPA să fie purificată din mediul de cultură.

O altă proteină produsă pe aceeași cale este **FactorulVIII**, o proteină necesară pentru formarea cheagului de sânge. Absența factorului respectiv determină hemofilia A. Multă vreme tratamentul hemofiliei se realiza cu ajutorul acestui factor purificat din sângele diverșilor donatori. Datorită însă sindromului imunodeficienței dobândite (SIDA), mulți hemofilici au fost infectați pe această cale. Factorul VIII este o proteină mare și complexă, iar gena respectivă este plasată pe cromozomul X.

3) **Producerea de anticorpi monoclonali**. Anticorpii sunt proteine cu o mare capacitate selectivă, care se pot cupla exclusiv cu o singură țintă (antigen). Într-o primă etapă, pentru producerea de anticorpi utili s-au utilizat myelomas, care sunt tumori ce secretă anticorpi. Dar ei erau lipsiți de specificitate. Acest neajuns a fost depășit prin tehnologia producerii de anticorpi monoclonali. Într-un șoarece sau șobolan se inoculează un anumit antigen, contra căruia se dorește obținerea de anticorpi. După ce se realizează răspunsul imun al animalului, se izolează limfocite din splină, care produc anticorpi, după care ele sunt fuzionate în masă cu ajutorul polietilenglicolului cu celulele unei linii myelomas ce nu mai produce anticorpi. Celulele

hibridom sunt izolate prin creşterea pe un mediu selectiv HAT. Celulele nefuzionate mor datorită faptului că celulele mielomatoase nu posedă enzima HPRT (hipoxantin-phosphoribosil-transferaza). Mediul HAT este mediul care nu conţine hipoxantină, aminopterină şi timidină. Celulele care posedă mutaţii în gena tk care codifică enzima timidinkinanza care fosforilează timidina liberă în timidină-monofosfat nu pot creşte pe mediul HAT.

Celulele de tip hibridom cresc continuu şi repede în cultură, la fel ca celulele mielomatoase şi produc anticorpi specificaţi de limfocitele de la animalul imunizat. Se selecţionează celulele hibridom capabile să producă cantităţi mari de anticorpi, astfel că în cultură ele sunt folosite pentru producţia industrială de anticorpi monoclonali. Aceştia sunt utilizaţi pentru diagnoza unor infecţii, pentru terapia cancerului şi pentru evidenţierea tumorilor pentru radioscopie.

4) **Sinteza de abzime**. Aceştia sunt **anticorpi** care funcţionează asemănător enzimelor pentru a cataliza o reacţie chimică. Abzimele sunt foarte utile în industria chimică şi în cea **farmaceutică.**

Prin sistemul imun se pot sintetiza milioane de tipuri de anticorpi. Enzimele catalizează reacţiile prin stabilirea unei structuri chimice intermediare între substrat şi produs, denumit stare de tranziţie (transition state). Dacă anticorpii monoclonali pot fi trecuţi într-o stare de tranziţie analoagă (o moleculă asemănătoare stării de tranziţie a unei reacţii chimice), atunci unii anticorpi pot avea o activitate catalitică.

Se începe prin injectarea unui şoarece cu un **antigen**, iar după răspunsul imun se izolează limfocite din splină şi se foloseşte tehnica PCR pentru amplificarea ADNc al lanţurilor grele (H) şi uşoare (L) ale anticorpilor pespectivi. Cele două lanţuri (H şi L) se clonează separat în vectori-fagi. Ei sunt astfel recombinaţi in vitro, pentru a genera o bibliotecă combinatorie probabilistică a fagilor care conţin lanţul H şi L. Aceşti fagi sunt plasaţi pe o cultură bacteriană pe mediu solid, astfel că plăjile de liză conţin fiecare un anticorp unic. Se utilizează apoi un **antigen marcat radioactiv**, similar cu cel folosit pentru realizarea bibliotecii genice. Din analiza unui milion de plăji de liză, s-au identificat 200 de clone (deci 1/5.000) care produc un anticorp capabil să se cupleze cu antigenul respectiv. Fagii dintr-o plajă de liză amintită codifică anticorpii exprimaţi în olaja de liză. După aceea, foarte uşor se clonează lanţurile H şi L din ADN al fagului respectiv. Acest ADNc se transferă în celule bacteriene sau de mamifer cu ajutorul unui vector, astfel că se pot produce cantităţi mari de anticorpi prin cultura celulelor în bioreactoare.

De obicei se utilizează fagul λ, dar în ultima vreme se folosesc fagii filamentoşi, cum este M13, care prezintă anticorpi la suprafaţa fagului. În acest fel selecţia fagilor care posedă ţinte puternice pentru anticorpi se poate realiza în soluţie.

Riscurile pentru sănătatea umană şi pentru mediul înconjurător prezentate de organismele modificate genetic

Impactul mondializării şi progresului economic asupra alimentaţiei umane În general, avantajele creşterilor de producţie sunt diminuate de neîncrederea consumatorilor. OMG au dat naştere, în ultima perioadă, unor dezbateri aprinse, atât pe plan mondial, cât şi în România. Experimentele de până acum au dovedit că sunt posibile: o creştere a rezistenţei la antibiotice, apariţia unor alergii, mărirea toxicităţii în organism. În ţările din Uniunea Europeană, există un adevărat scandal pe tema securităţii alimentaţiei. Comisia Europeană a limitat introducerea pe piaţă a organismelor modificate genetic, în urma dovezilor privind riscul pentru sănătatea umană şi mediul înconjurător aduse de organizatia Greenpeace. În urma unor experienţe pe şobolani hrăniţi cu cartofi modificaţi genetic s-a ajuns la concluzia că animalele s-au ales cu un sistem imunitar slăbit şi cu afecţiuni ale creierului. Referiri la produsele transgenetice se regăsesc şi în unele acte normative din România. Astfel din anul 2000, testarea, utilizarea şi comercializarea OMG sunt supuse unui regim special, prevăzut de Ordonanţa nr. 49. Orice import, export, comerţ cu produse modificate genetic este obligatoriu să fie notificat şi avizat de

către Comisia Națională pentru Securitate Biologică (CNSB). Pe ambalajele produselor comercializate trebuie specificat dacă există în componența lor OMG. Ordonanța de urgență nr. 97 din iunie 2001 privind reglementarea circulației și comercializării alimentelor definește alimentele provenite din OMG și/sau OMG ca fiind alimente care conțin o combinație nouă de material genetic obținut prin tehnici de biotehnologie și/sau organisme (orice entitate capabilă să reproducă sau să transfere material genetic) în care materialul genetic a fost modificat printr-un proces care nu are loc în mod natural prin împerechere și/sau recombinare naturală. În condițiile utilizării îngrășămintelor chimice, culturile transgenetice au un randament mai mare. Se consideră, de asemenea, că agricultura transgenetică poate contribui în viitor la revoluționarea unui alt domeniu, respectiv al **farmacologiei**, alimentele concepute prin intermediul noilor tehnologii fiind orientate în direcția satisfacerii unor necesități terapeutice distincte.

Ingineria genetică se diferențiază de metodele tradiționale prin aceea că genele sunt transferate între specii diferite și nu în cadrul aceleiași specii, transfer imposibil de realizat în condiții naturale. Apare, în aceste condiții încă o problemă, acea a consecințelor asupra echilibrului natural, a gradului în care este afectat acesta.

Însă, adepții utilizării soiurilor transgenetice mai aduc încă un argument: OMG, datorită modificărilor genetice la care au fost supuse devin rezistente la boli și dăunători și nu ai necesită folosirea de pesticide, substanțe atât de periculoase. Legat de folosirea pesticidelor cercetătorii francezi au făcut o precizare care poate să schimbe total felul de alimentație. După părerea dr. Dupont și Molkhou, „aproape jumătate din populația mondială suferă, a suferit sau va suferi de o patologie alergică alimentară". Cei doi oameni de știință au observat, începând din anii 1980, în toate spitalele din Franța, o creștere foarte mare a manifestărilor alergice de origine alimentară, cu alergie uneori violentă, provocată de introducerea în organism a unor substanțe străine, pornind de la: mâncărimi, urticarie, varsaturi până la edem sau șoc anafilactic, patologii care uneori sunt mortale. În Franța, unele organisme publice, cum ar fi Institutul Național pentru Cercetarea Agronomică, au început să pună în discuție aceasta „problemă serioasă a sănătății publice".

b. Riscuri ambientale Limitele evaluării riscurilor prin culturi experimentale. Culturile experimentale efectuate în 15 țări ale Europei, înaintea primelor culturi comerciale de organisme modificate genetic, nu a urmărit și nu a furnizat niciodată informații privind eventualul impact asupra mediului înconjurător. De fapt, scopul principal al acestor culturi experimentale era de a asigura mai bine "securitatea biologică" a plantelor testate, adică optimizarea condițiilor de expresie și conservare a transgenelor.

c. **Riscuri privind diseminarea de polen transgenic:** Încrucișări între plante transgenice și plante spontane înrudite; Apariția unor buruieni rezistente la ierbicidele totale; Schimburile de gene între plantele cultivate și cele spontane înrudite cu tipurile ancestrale sunt cunoscute de multă vreme. Nu există, deci, nici un motiv să nu ne gândim că acest fenomen n-ar fi posibil și în cazul plantelor transgenice, condiția este ca varietățile și speciile apropiate să se găsească în aceeași regiune geografică. De altfel, se știe astăzi că polenul de rapiță-OGM poate parcurge mulți kilometri, mai ales când este deshidratat și când condițiile climatice sunt favorabile. Practicând o cultură de rapiță transgenică, rezistentă la un ierbicid determinat, se riscă, așadar, **accelerarea selecției de buruieni hibride**, rezistente la același ierbicid. Prin rotația de culturi de plante transgenice (aparținând sau nu aceleiași specii), programate să reziste fiecare la un ierbicid diferit, se riscă a se favoriza apariția de plante adventive rezistente la două, chiar trei ierbicide diferite, adică o **rezistență multiplă**, codificată de genele de rezistență la fiecare dintre ierbicide.

Încrucişări între varietăţi transgenice şi convenţionale ale aceleiaşi specii.

d. Riscuri legate de plantele rezistente la atacul insectelor

Apariţia de dăunători rezistenţi la proteina-insecticid a porumbului-Bt. Apariţia de insecte rezistente la insecticide este cunoscută de mai bine de 50 de ani şi ea nu a încetat să crească rapid, pe măsură ce se intensifica folosirea pesticidelor în agricultura de tip industrial (intensivă şi super intensivă). această prodigioasă adaptare a unor insecte la substanţele toxice costă enorm firmele producătoare de pesticide, care sunt obligate să găsească noi substanţe care să contracareze rezistenţa dăunătorilor. Intoxicarea altor insecte de către „plantele insecticide". Toxicitatea „plantelor insecticide" pentru prădătorii insectelor dăunătoare **e. Drumul toxinelor insecticide în lanţurile trofice şi în soluri**

Riscuri legate de cultura plantelor rezistente la insecte. Unul din principalele organisme modificate genetic care sintetizează astfel de toxine este porumbul Bt, care cuprinde numeroase soiuri transgenice. Acest porumb este folosit atât în alimentaţia oamenilor (ulei, **amidon**, sirop de glucoză etc), cât şi la furajarea animalelor (boabe şi însilozat, „corn gluten feed" etc). toxina insecticidă naturală este inofensivă pentru animalele cu sânge cald (deci şi pentru om), însă trebuie reamintit că toxina sintetizată de organismele modificate genetic este o formă activă a acesteia. Dar, nici un studiu toxicologic nu s-a realizat asupra formei active a acestei toxine.

f. Riscuri legate de cultura plantelor rezistente la virusuri.

Principalul mecanism de evoluţie naturală a virusurilor îl constituie recombinările secvenţelor genetice. De aceea, unii cercetători au lansat ideea unei posibile recombinări între gena virală cp, prezentă într-o anumită plantă, cu gene ale unui virus înrudit care a infectat o plantă rezistentă sau care se află în mod natural în aceasta. Astfel de recombinări au fost deja observate experimental în laborator, fără a se fi putut determina dacă noul virus ar fi mai mult sau mai puţin patogen decât virusul parental. Marea necunoscuta este reprezentata de frecvenţa cu care aceste recombinări s-ar produce în natură, mai ales în vastele culturi transgenice, unde sunt prezente numeroase gene virale. În anul 1999, o serie de cercetări arată că infecţiile virale erau frecvente în populaţiile de *Brassica napus*: peste jumătate din eşantioanele examinate conţineau mai mult de un tip de virus, şi în aceste condiţii par justificate îngrijorările generate de apariţia posibilă a unor noi virusuri dăunătoare plantelor.

Evaluarea riscurilor pentru sănătatea oamenilor

Sunt periculoase pentru sănătatea oamenilor alimentele cu origine transgenică? Dar medicamentele? Răspunsurile nu sunt unanime şi incertitudinile sunt numeroase. Declaraţiile profesorului Kahn (1999), aparător al transgenezei şi expert pe lângă Uniunea Europeană, sunt liniştitoare: „testele cerute înaintea punerii pe piaţă ale unei plante transgenice se apropie de cele cerute pentru un nou medicament", ceea ce înseamnă că ele sunt mult mai complexe decât cele cerute pentru un aliment nou, non-transgenic. În plus, el adaugă: „atunci când transgena este socotită ca determinând rezistenţa la un ierbicid, se cere un studiu toxicologic aprofundat privind metabolismul ierbicidului utilizat asupra plantei transgenice". Numeroase păreri însă susţin că modificările genetice generează numeroase efecte adverse asupra sănătăţii umane şi a mediului. Este cazul sa ne amintim si de numeroasele scandaluri legate de efectele adverse ale unor medicamente: Talidomida, sindromul Golfului, anticonceptionale, cardiovasculare, sedative, si cel mai recent Tamiflu. **Efecte alergice şi toxice asupra oamenilor**. Majoritatea culturilor modificate genetic sînt concepute să reziste la aplicări fără limită de ierbicide. Două dintre cele mai folosite chimicale, bromoxynil şi glyphosat (Roundup TM) sînt asociate cu tulburări de creştere ale fetuşilor, cu tumori, carcinoame, limfoame non-Hodgkin. Se consideră că soiul de porumb modificat genetic numit StarLink declanşează reacţii alergice precum voma, diareea şi şocul anafilactic. Unii consultanţi ştiinţifici din SUA consideră că toate proteinele din

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

porumbul modificat genetic (36% din producția SUA) ar putea acționa ca agenți antigenici și alergenici.

Efecte alergice şi otrăvitoare asupra plantelor şi animalelor În această privință, cercetătoarea Irina Ermakova a efectuat un experiement la Institutul de Neurofiziologie și Studiul Activității Nervoase Superioare de pe lângă Academie Rusă de Știință. Nouă femele de cobai au fost împărțite în 3 grupe de câte 3: un grup de control, un grup în a cărui hrană s-a adăugat făină de soia modificată genetic şi un grup care a consumat alimente amestecate cu făină de soia obişnuită. Au fost numărate femelele care au născut şi numărul de cobai născuți şi morți. După primul stagiu, cobaii au fost împărțiți în două grupe, una hrănită cu făină de soia modificată genetic, cealaltă hrănită cu făină de soia obişnuită. A rezultat un număr anormal de mare de decese printre urmaşii femelelor hrănite cu soia modificată genetic. În plus, 36% dintre acesti cobai cântăreau mai puțin de 20 g, fapt care evidenția starea lor de extremă slăbiciune. Acesta este primul studiu care a demonstrat o dependență clară între hrănirea cu alimente modificate genetic şi starea de sănătate a urmaşilor. Morfologia şi structurile biochimice ale cobailor sînt foarte asemănătoare cu cele ale oamenilor, ceea ce este extrem de îngrijorător în ce priveşte efectele asupra mamelor şi fetusilor, în contextul în care se urmăreşte introducerea de cât mai multe OMG în alimentația umană, din rațiuni comerciale.

Efecte dăunătoare asupra dinamicii populației de specii în mediul gazdă şi asupra diversității genetice a fiecăreia dintre aceste populații; plantele modificate genetic sînt specii exotice, capabile să pună stăpânire pe noi teritorii, eliminând alte culturi şi creînd supergândaci şi superburuieni, care obligă la folosirea a şi mai multe chimicale toxice. Plantele modificate genetic pot poleniza încrucişat cu plantele culturilor similare, fenomen care a provocat deja distrugerea multor ferme organice, ale căror standarde nu permit folosirea semințelor modificate genetic.

Sensibilitatea modificată a agenților patogeni, facilitând răspândirea bolilor infecțioase sau crearea de noi vectori;

Diminuarea acțiunii tratamentelor profilactice sau terapeutice medicale, veterinare sau fitofarmaceutice prin transferul genelor care conferă **rezistență la antibioticele utilizate** în medicină; deoarece modificarea genetică este o ştiință cât se poate de inexactă, geneticienii folosesc o genă-marker pentru a stabili dacă inserția genelor în organisme a reuşit. Adesea, gena-marker este tocmai una dintre cele care codează rezistența la antibiotice. Organizația Mondială a Sănătății a avertizat înca din 2001 că oamenii manifestă deja niveluri de **rezistență la antibiotice** care îi fac mai vulnerabili la bolile infectioase.

Efecte asupra biogeochimiei, prin schimbari în descompunerea în sol a materialului organic.

Pornind de la amenințările pe care OMG-urile le reprezintă pentru **sistemul imunitar uman** şi pentru biodiversitatea planetei, cercetătorii din diverse domenii ale cunoaşterii (medicina, agronomia), precum şi organizațiile ecologiste au creat un puternic curent de opinie împotriva producerii plantelor transgenice, dar cu toate acestea, marile companii cultivă OMG-urile la scară largă în lume, în disprețul opiniei publice.

Riscurile de mediu prezentate de plantele de soia OMG din cauza utilizării sporite de glifosat Glifosatul dăunează amfibienilor. Declinul populațiilor de amfibieni la nivel global a stârnit interesul cercetătorilor asupra rolului pe care îl joacă în acest proces pesticidele. Orice evaluare a OMG-urilor trebuie să includă nu numai evaluarea efectelor directe, dar şi pe cea a efectelor indirecte (Directiva 2001/18/EC pentru eliberarea deliberată a OMG în mediu).

Utilizarea sporită a Roundup-ului (glifosat) este asociată cu aprobarea pentru cultivare a plantelor de soia modificate genetic. Efectele utilizării sporite a Roundup-ului în agro-ecosisteme trebuie evaluate ca efecte indirecte ale cultivării plantelor de soia MG. Glifosatul are efecte nocive şi asupra altor specii. Roundup întârzie şi chiar opreşte (în anumite concentraţii) diviziunea celulară a celulelor embrionare de *Sphaerechinus granularis* (MARC şi col. 2002, MARC şi col. 2004). **Buruieni rezistente la glifosat** Cercetătorii şi compania Monsanto au considerat la începutul anilor 1990 că este imposibil ca buruienile să dezvolte rezistenţă la Roundup (şi respectiv la glifosat), datorită modului său specific de acţiune. După doar 4 ani de la începerea cultivării de soia MG, în 1996 au fost identificate în culturi primele plante din specia *Conyza canadensis* rezistente la pesticid. După 7 ani au fost identificate specimene de *Conyza canadensis* cu rezistenţă multiplă la pesticide.

Problemele legate de plante voluntare de soia MG Pe lângă buruienile cu rezistenţă la pesticide, cultivatorii trebuie să facă faţă şi plantelor voluntare. Compania producătoare de substanţe chimice Syngenta face reclamă unui nou produs care este capabil să facă faţă acestei probleme. Astfel este pornită o cascadă care va duce până la urmă la folosirea pe scară din ce în ce mai largă a amestecurilor de pesticide, ducând implicit şi la un nivel crescut de folosire a erbicidelor. Aprobarea cultivării plantelor de soia MG va avea consecinţe negative asupra faunei şi a sănătăţii populaţiei umane, aşa cum s-a întâmplat în ţări precum Argentina şi Statele Unite.

Utilizarea sporită de pesticide Monsanto a promovat plantele sale de soia MG ca fiind uşor de cultivat şi necesitând un consum scăzut de pesticide. Dar amândouă afirmaţiile s-au dovedit a fi inexacte la doar 5 ani după aceea. Aşa cum a fost arătat mai sus, eficacitatea stropirilor cu Roundup este scăzută şi duce la apariţia de buruieni rezistente la erbicid. Cultivatorii au încercat să elimine această problemă prin folosirea unor cantităţi mai mari de pesticid, şi cu folosirea de amestecuri de pesticide, făcând astfel din ce în ce mai dificilă ţinerea sub control a apariţiei de plante cu rezistenţă multiplă.

Sindromul morţii subite În timpul anului 1997, primul an în care s-a folosit pe scară largă glifosatul pentru stropirea culturilor de soia MG, o epidemie serioasă de SDS (sindromul morţii subite) a avut loc şi câteva varietăţi de cultură de soia MG au fost afectate.

În raportul realizat de organizaţia Greenpeace Romania se estimează că principalul risc al plantelor de soia modificate genetic este acela că evaluarea riscurilor este relativă, mai ales prin ignorarea celor pe termen lung. Studiile pe termen lung, cu durata de 24 de luni, ar oferi posibilitatea de evaluare a efectelor toxice asupra organismului uman, cu precădere a celor ce vizează **sistemul imunitar** şi a riscurilor de producere a diferitelor **forme de cancer**.

O serie de date indică necesitatea imperioasă a efectuării unor studii care să evalueze efectele pe termen lung ale plantelor de soia modificate genetic. Studii pe vaci hrănite cu soia modificata genetic arata că acestea produc **lapte cu conţinut crescut în grăsimi**, cauza acestei creşteri nefiind cunoscută în prezent. În plus, la aceste animale sunt încă necunoscute efectele produse în urma consumului de soia modificata genetic la nivelul ţesuturilor şi organelor interne. Este posibil ca produşii de metabolizare din soia modificată genetic să interacţioneze în mod nociv cu componentele celulare. Un studiu de şase săptămâni efectuat pe iepuri hrăniţi cu soia modificată genetic a indicat un nivel scăzut al viabilităţii spermei şi anomalii ale spermatozoizilor. O serie de efecte nocive asupra sănătăţii oamenilor şi a mediului pot apărea ca efect indirect, ca urmare a tratării culturilor de soia modificată genetic cu cantităţi sporite de ierbicide. Plantele de soia modificate genetic au fost promovate în ideea că sunt mai uşor de cultivat şi necesită o cantitate mai mică de ierbicide. Ca urmare a apariţiei unor buruieni rezistente la ierbicid, s-a ajuns în situaţia contrară, anume la folosirea unor cantităţi din ce în ce mai mari de ierbicide. O serie de studii indică riscurile importante ale folosirii acestui ierbicid

glifosat pentru sănătatea umană: o incidență crescută a **limfomului non-Hodgkin**, riscul crescut de **avort** în rândul femeilor care lucrează la ferme, procentul crescut de **malformații congenitale** al copiilor din familiile de fermieri, **efectul toxic** asupra celulelor placentare și testiculare, posibil ca urmare **a interferării sintezei de hormoni steroizi**. Riscul de producere a unor alergii ca urmare a consumului de soia modificata genetic este de asemenea subestimat și deocamdată neevaluat. Până în prezent s-au constatat, în cadrul unor studii, importante efecte alergenice ale plantelor de mazăre modificată genetic, constând din producerea de anticorpi față de o proteină din aceasta plantă, concretizata prin producerea unei **reacții inflamatorii** la injectarea acestei proteine și a unor efecte respiratorii de **tip astmatic**, **hipersecreție bronșică** și **inflamații ale căilor respiratorii** și a plămânilor ca urmare a inhalării proteinei. Mai mult, s-a constatat posibilitatea dezvoltării unor reacții alergice de tip încrucișat.

Impactul ecologic al cultivării plantelor modificate genetic De la prima lor comercializare, în anul 1996, plantele tolerante la principiul activ erbicid glifosat, care exprimă proteina CP4EPSPS, au fost cultivate pe milioane de hectare. Nu a fost adusă nici o dovadă a existenței unor efecte dăunătoare sau nedorite asociate cultivării și/sau consumului soiei RR, altor plante RR sau proteinelor CP4EPSPS sintetizate de acestea.

Concluzia generală a cercetărilor realizate până acum: modificarea genetică nu a afectat biologia plantelor de cultură, iar utilizarea acestor tehnologii de combatere a buruienilor are efect benefic asupra mediului. În anul 2005, Brooks și Barfoot au publicat rezultatele evaluării impactului asupra mediului al PMG tolerante la erbicide (TE) aflate în culturi comerciale în anul 2004 și în intervalul 1996-2004, impact realizat prin intermediul regimului specific de erbicidare

Introducerea PMG în mediu în scop comercial poate contribui la reducerea semnificativă a emisiilor de gaze de seră pe două căi: O primă cale constă în diminuarea consumului de combustibil determinată de reducerea numărului de tratamente cu pesticide; A doua cale, constă în utilizarea sistemelor de cultură cu lucrări minime ale solului, care presupun nu doar reducerea consumului de combustibil ci și reducerea eroziunii și ameliorarea calității solului. Ameliorare determinată de cresterea cantității de resturi vegetale și scăderea ratei de descompunere a materiei organice în sol, fapt ce conduce, desigur, la creșterea cantității de carbon din sol și, implicit, la diminuarea emisiilor de gaze de seră. Reducerea emisiilor de gaze poate fi cuantificată prin stabilirea cantității de CO2 care nu mai ajunge în atmosferă ca urmare a diminuării consumului de combustibil și conservării carbonului în sol.

Cultivarea PMG tolerante la erbicide a influențat alegerea erbicidului, modul de aplicare a acestuia și numărul tratamentelor de erbicidare. De exemplu, cultura rapiței TE în SUA a permis renunțarea la erbicidele reziduale în favoarea erbicidelor postemergente cu spectru larg și aplicarea lor foliară.

Prezența pe piața a produselor modificate genetic Între Europa și Statele Unite ale Americii se duce un adevărat război transatlantic pe tema manipulării genetice. La 13 ani de la cultivarea în scop comercial a primelor plante modificate genetic, comunitatea științifică internațională încă nu stabilise clar dacă acestea au sau nu efecte negative asupra organismului uman. În Statele Unite s-a dezvoltat o industrie de creare a unor asemenea plante, pe care încearcă să le exporte în întreaga lume. În Europa, unde organizațiile ecologiste sunt deosebit de puternice, OMG-urile au viață grea. O tabără susține că plantele modificate genetic ar putea fi o soluție în viitor pentru schimbările climatice, cealaltă spune că, din contră, reprezintă un atentat la biodiversitate și la sănătatea omului. Ultima găselniță în materie de OMG-uri este introducerea unor **gene umane** plantelor, pentru a fi transformate în **aliment-medicament (alicamente)**.

Savanții încearcă să obțină vin cu aromă de căpşuni, banană sau zmeură. Pentru mulți dintre susținătorii manipulării genetice, **medicina de mâine va fi cu siguranță transgenică: fructe-vaccin, bacterii-dopante, lapte medicament** etc. Multe dintre acestea au fost deja experimentate, altele sunt pe cale de a fi. Înrăutățirea condițiilor pedoclimatice, diminuarea resurselor naturale şi explozia demografică în anumite zone le-au dat cercetătorilor argumente să justifice "inventarea" unor soluții de diversificare a raselor de animale şi a soiurilor de plante. Dar, susțin unii, s-a ajuns prea departe. De exemplu, genele unui peşte pot fi transferate la o plantă de tomate sau la o căpşună pentru a le conferi rezistență sporită la temperaturi foarte scăzute. Plantele obținute prin astfel de tehnici de inginerie genetică sunt forțate să producă substanțele chimice ale peştelui, ajungând să elaboreze o substanță pe care peştii o produc în mod natural, pentru a supraviețui în apă rece.

Ecologiştii susțin că nimeni nu va dori să mănânce alimente derivate parțial de la om, "**Alimente Frankenstein**" deoarece ar semăna cu un act de canibalism. Unii îşi simt amenințate credințele, valorile şi principiile etice, alții - ființa biologică. O parte a comunității ştiințifice susține că folosirea alimentelor ce conțin gene provenind de la insecte, peşti şi animale pot provoca **efecte imprevizibile în organism**.

În ultimii ani, medicii se confruntă tot mai des cu **sindroame alergice** noi datorită alimentelor. Genele nou introduse pot produce proteine la care unii oameni au alergii. Cele mai frecvente alergii sunt la ouă, lapte, peşte, soia şi cereale. Prezența genelor-marker poate declanşa **creşterea rezistenței la antibiotice**. Specialiştii în industria alimentară nu sunt însă convinşi dacă alimentele provenind din organisme modificate genetic sunt mai periculoase pentru om decat, de pildă, **aditivii industriali**, ca E-urile sau cei descrisi in *Codex Alimentarius* s.a.

Europa şi consumatorii europeni rămân neîncrezători cu privire la organismele modificate genetic. Cu ocazia celui mai recent sondaj de opinie efectuat în statele membre UE, majoritatea cetățenilor s-au declarat împotriva utilizării acestora. Unele state membre UE, precum Austria, Polonia şi Germania, au stabilit chiar zone interzise cultivării OMG-urilor. Rezistența este motivată de temerile că OMG-urile ar putea dăuna biodiversității şi sănătății umane.

Biotehnologia şi ştiințele vieții joacă un rol din ce în ce mai important în viața noastră, care va afecta aproape fiecare domeniu al activității umane. **Biotehnologia** a avut un început întârziat în Europa, însă situația s-a îmbunătățit. Europa are aproape **2.000 de companii din domeniul biotehnologiei**, dar nu este încă de ajuns, iar plantele modificate genetic pot deveni o sursă majoră de material pentru **produsele biofarmaceutice**.

Organismele modificate genetic constituie un risc serios pentru sănătate. Consumul alimentelor ce conțin gene provenind de la insecte, peşti şi animale pot provoca efecte imprevizibile în organism, insuficient studiate. În ultimii ani, medicii se confruntă tot mai des cu sindroame alergice noi datorită creşterii toxicității alimentelor. Genele nou inserate pot produce proteine la care unii oameni au alergii. Cele mai frecvente alergii sînt față de lapte, ouă, peşte, soia, cereale. Alimentele procesate prin inginerie genetică, adeseori apar pe piață fără o informare adecvată a consumatorilor. Prezența genelor-marker poate declanşa creşterea rezistenței la antibiotice, în special la kanamicină, ampicilină. Numeroşi microbiologi consideră că anumite gene-marker conferă rezistență la anumite familii de antibiotice şi chiar la antibiotice noi. Aceştia consideră ca fiind posibil transferul unor astfel de gene de la plantă la om, via bacteriile tubului digestiv. O soia îmbogățită în metionină, prin transferul unei gene de la nucile de Brazilia (*Bertholletia excelsa*), s-a dovedit periculoasă pentru consumul uman. S-au înregistrat alergii grave la persoanele care au consumat această varietate de soia. Se cunoaşte că plantele de soia rezistente la erbicide produc nivele sporite de **fitoestrogeni**, ceea ce ar

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

presupune un risc pentru populațiile la care soia reprezintă o mare parte a dietei, cum sunt japonezii (Duca M. şi colab.). Fitoestrogenii sînt similari cu **hormonii estrogeni animali** care reglează diferențierea sexuală, metabolismul calciului, sistemul imun, coagularea sângelui. De asemenea, ar putea să apară efecte secundare, cu totul imprevizibile, deoarece transgenele se inseră la întîmplare în genomul organismului-gazdă, fapt ce ar putea întrerupe secvențele de exprimare ale genelor învecinate, activînd sau inactivînd căi metabolice neprevăzute, conducînd la formarea de produşi celulari necunoscuți. Se pare că, în 2006, aproape 100% din cultura de soia din România a fost modificată genetic, din cauza contaminării culturilor nemodificate de la cele modificate. Oficial, doar 75% din cultura de soia este modificată, spune Anamaria Bogdan, coordonator de proiecte Greenpeace pentru România. Asta înseamnă peste 300.000 de tone de soia modificată, care nu se ştie exact unde a ajuns. Cel mai probabil ea este ingredient în maionezele, mezelurile pe bază de soia şi pateurile vegetale de pe rafturile alimentarelor. După estimările fermierilor, culturile de soia sunt pe primul loc la producția românească de OMG.

9. Legislația si controlul în privinta OMG

Detecția noilor alimente derivate din OMG. Deoarece acestea nu pot fi vândute în Uniunea Europeană, ca aliment sau ingredient alimentar, fără a respecta Legislația noilor alimente ("Novel foods legislation"), care impune evaluarea siguranței şi etichetarea alimentelor care conțin OMG la un nivel care depăşeşte 1% material genetic modificat. În scopul implementării acestor reglementări, au fost dezvoltate şi validate metode de detecție (bazate pe principiile biologiei moleculare) calitativă şi cantitativă pentru OMG şi au fost înființate laboratoare analitice dotate cu aparatură validată de CEN TC 275 WG 11. Detecția se realizează pe baza noilor proteine specifice OMG sau a materialului genetic străin. Detecția este dificilă, deoarece există mulți compuşi care pot interfera, precum poliglucidele, care pot inhiba **PCR** (Polymerase Chain Reaction), conducând la rezultate fals pozitive. Procesarea alimentelor provoacă o denaturare a proteinelor, apoi a ADN, care nu mai poate fi recunoscut de primeri si anticorpi (fiind prezent în cantitate foarte redusă). Cea mai eficientă metodă de detectare a materialului transgenic este amplificarea secvenței străine a promotorului şi genei, etapele metodei fiind: 1) extracția ADN; 2) amplificare prin PCR (Polymerase Chain Reaction); 3) vizualizarea produşilor PCR prin gel-electoforeză şi determinare a lungimii perechilor de bazei ale genei străine; 4) confirmarea rezultatelor. **Metoda clasică a PCR** detectează prezența compuşilor specifici ai OMG (proteine şi/sau ADN), este extrem de sensibilă şi se poate realiza pe produse alimentare din depozitele distribuitorilor sau produse din supermarket. Dezavantajele utilizării acestei metode sunt reprezentate de consumul de timp, posibilitatea contaminării si reproductibitatea scazută în determinarea concentrației exacte de ADN care a fost intodusă în PCR. Pentru eliminarea acestor deavantaje, au fost dezvoltate şi validate metode şi instrumente performante, bazate pe determinarea cantitativă a modificărilor genetice (**real-time based PCR"**), amplificarea produşilor putând fi observată "on-line" de-a lungul procesului PCR, deoarece fiecare dublare a țintei este măsurată prin fluorescența specifică.

Alte metode de detecție a modificărilor genetice sunt **metoda ELISA** si Western- Blott. Cele două metode utilizează acelaşi principiu, dar metoda Western-Blott este foarte laborioasă, neputând fi utilizată ca metodă de rutină.

Reglementarea Europeană a organismelor modificate genetic Confruntată pe de o parte cu opinia publică, din ce în ce mai ostilă organismelor modificate genetic, pe de altă parte cu lobby-ul industriaşilor dornici de a dezvolta piața plantelor transgenice, Comisia Europeană a elaborat o nouă directivă (Directiva 2001/18) mult mai preocupată de aplicarea principiului precauțiilor şi, totuşi, fără penalizări pentru industriile biotehnologice.

Pe lângă etichetare, reglementarea prevede asigurarea trasabilității organismelor modificate genetic începând de la semințe până la produsul finit, astfel încât ele să poată fi retrase rapid de pe piață în caz de necesitate. De asemenea noua reglementare prevede perfecționarea procedurilor de evaluare a impactului pe care noile organisme modificate genetic le pot avea asupra sănătății populației umane și asupra mediului înconjurător. Se face o singură autorizație pentru respectivul OMG și pentru toate operațiunile al căror obiect este acesta: cultivare, import, procesare ca aliment, ca furaj sau **produs industrial**, arbitrajul OMC referitor la libera circulație a produselor inclusiv cele rezultate din biotehnologie. După cum se vede în plan internațional există un cadru de reglementare pentru OMG bogat și pertinent. Rămâne ca el sa fie corect aplicat eliminându-se de la interpretarea lui: interesele de grup; interesele economice de companie; interesele politicii specifice unor partide și chiar ONG-uri.

Comisia națională pentru securitate biologică are drept obiect de activitate: punerea în aplicare a dispozițiilor legislative naționale în domeniu și a actelor juridice internaționale la care România este parte. În România funcționează un sistem administrativ și de decizie în domeniul rezultatelor biotehnologiilor cu atribuții bine stabilite.

Organismele implicate în reglementare în România (Legea 214/2002) De la data aderării României la Uniunea Europeană, cultivarea sau testarea plantelor superioare modificate genetic se va supune Aquis-ului Comunitar. Este corelată cu prevederile acordurilor de integrare în UE: (2) De la data aderării României la UE, în România se interzice cultivarea plantelor superioare modificate genetic, altele decât cele acceptate în UE, dupa normele care reglementează domeniul în UE. In prezent acestea sunt conroversate si probabil ca vor fi operate unele modificari.

10. Comentariu privind OMG

Cercetările genetice au arătat că multe boli specifice plantelor, animalelor sau **omului** își au originea în mici imperfecțiuni ale codului genetic. Ne putem imagina cît de grave pot fi efectele secundare și accidentele în cazul tuturor acestor tehnologii care se joacă cu ordinea și echilibrul atît de fragil al celulelor vieții. Progresele realizate în ultimii ani în știință și în tehnologie au avut un impact puternic asupra sectorului agricol, asupra celui alimentar si a biotehnologiilor farmaceutice din întreaga lume. Metode novatoare de producție au revoluționat și chiar au eliminat numeroase sisteme tradiționale, afectând capacitatea de producere a hranei pentru o populație aflată în expansiune continuă.

Aceste evenimente au generat numeroase schimbări în economie și în organizarea socială, dar și în gestiunea resurselor planetei. Mediul natural a fost bulversat de progresele tehnologice, care au permis nu doar obținerea ameliorărilor genetice prin selecție, ci și crearea de noi combinații genetice pentru a obține vegetale, animale și pești cu rezistență și productivitate teoretic mult mai mare. **Biotehnologia modernă** oferă noi posibilități de dezvoltare în sectoare foarte diverse, de la agricultură la **producția farmaceutică**, iar dezbaterile la nivel mondial asupra organismelor modificate genetic sunt fără precedent în ultima perioadă și au polarizat atât atenția oamenilor de știință, cât și pe cea a producătorilor de bunuri alimentare, a consumatorilor, a grupurilor de apărare a interesului public, a instituțiilor publice și a factorilor de decizie. **Tehnicile transgenezei** conferă astfel omului puterea cvasinelimitată, cel puțin teoretic, de a odifica patrimoniul ereditar al tuturor ființelor care-l înconjoară, inclusiv al propriei sale specii.

In raportul realizat de organizatia **Greenpeace Romania** se estimeaza ca principalul risc al plantelor de soia modificate genetic este acela ca evaluarea riscurilor este relativa, mai ales prin ignorarea celor pe termen lung. Studiile pe termen lung, cu durata de 24 de luni, ar oferi posibilitatea de evaluare a efectelor toxice asupra organismului uman, cu precadere a celor ce vizeaza sistemul imunitar si a riscurilor de producere a diferitelor forme de cancer. Mai mult,

evaluarile plantelor de soia modificate genetic sunt incomplete deoarece au fost efectuate pe plante netratate cu ierbicidul Roundup, la care acestea sunt rezistente. O serie de date indica necesitatea imperioasa a efectuarii unor studii care sa evalueze efectele pe termen lung ale plantelor de soia modificate genetic. Studii pe vaci hranite cu soia modificata genetic arata ca acestea produc lapte cu continut crescut in grasimi, cauza acestei cresteri nefiind cunoscuta in prezent. In plus, la aceste animale sunt inca necunoscute efectele produse in urma consumului de soia modificata genetic la nivelul tesuturilor si organelor interne. Soarecii hraniti cu soia modificata genetic au prezentat o modificare semnificativa a greutatii corporale precum si a rinichilor si testiculelor. Studii efectuate in Italia pe soareci hraniti cu soia modificata genetic indica unele perturbari la nivel celular, obiectivate prin alterarea activitatii enzimatice a pancreasului, alterari morfologice ale celulelor pancreatice, hepatice scaderea nivelului proenzimei α-amilaza pancreatica, modificari care deocamdata nu au fost explicate. Este posibil ca produse de metabolizare din soia modificata genetic sa interactioneze in mod nociv cu componentele celulare. Un studiu de sase saptamani efectuat pe iepuri hraniti cu soia modificata genetic a indicat un nivel scazut al viabilitatii spermei si anomalii ale spermatozoizilor. O serie de efecte nocive asupra sanatatii oamenilor si a mediului pot aparea ca efect indirect, ca urmare a tratarii culturilor de soia modificata genetic cu cantitati sporite de ierbicide. Plantele de soia modificate genetic au fost promovate in ideea ca sunt mai usor de cultivat si necesita o cantitate mai mica de ierbicide. Ca urmare a aparitiei unor buruieni rezistente la ierbicid, s-a ajuns in situatia contrara, anume la folosirea unor cantitati din ce in ce mai mari de ierbicide. O serie de studii indica riscurile importante ale folosirii acestui ierbicid glifosat pentru sanatatea umana: o incidenta crescuta a limfomului non-Hodgkin, riscul crescut de avort in randul femeilor care lucreaza la ferme, procentul crescut de malformatii congenitale al copiilor din familiile de fermieri, efectul toxic asupra celulelor placentare si testiculare, posibil ca urmare a interferarii sintezei de hormoni steroizi. De asemenea, se considera ca folosirea pe scara larga a glifosatului a avut un rol important in diminuarea populatiei de amfibieni de pe intreg globul.

Riscul de producere a unor alergii ca urmare a consumului de soia modificata genetic este de asemenea subestimat si deocamdata neevaluat. Pana in prezent s-au constatat, in cadrul unor studii, importante efecte alergenice ale plantelor de mazare modificata genetic, constand din producerea de anticorpi fata de o proteina din aceasta planta, concretizata prin producerea unei **reactii inflamatorii la injectarea** acestei proteine si a unor efecte respiratorii de **tip astmatic**, **hipersecretie bronsica** si **inflamatii ale cailor respiratorii** si a plamanilor ca urmare a inhalarii proteinei. Mai mult, s-a constatat posibilitatea dezvoltarii unor **reactii alergice de tip incrucisat**. In prezent nu sunt cunoscute efectele alergice ale plantelor de soia modificate genetic, neexistand studii valide in acest scop.

Studiile genetice au evidentiat ca in plantele de soia modificate genetic au aparut o serie de secvente genice de origine necunoscuta in vecinatatea insertului care contine gena artificiala, astfel incat insertul, care a fost prezentat autoritatilor europene de catre firma producatoare a plantelor de soia modificate genetic, **nu este cel corect**. Chiar daca compania producatoare considera ca aceste secvente genice nu prezinta nici un risc pentru sanatate pentru ca acestea nu sunt transcrise in ARN sau proteine, se constata inca o data necesitatea unei atente evaluari a efectelor pe termen lung si neignorarea noilor molecule de ARN sintetizate in urma introducerii insertului. Aceasta mai ales in conditiile in care nu se cunosc inca functiile acestui ARN sintetizat.

Avand in vedere **riscurile potentiale asupra sanatatii oamenilor** si a mediului, ca urmare a cultivarii si consumului de soia modificata genetic, incomplet studiate la acest moment, organizatia Greenpeace Romania considera ca este necesar un semnal de alarma. Aceasta organizatie saluta faptul ca, incepand din anul 2007, culturile de soia modificata genetic nu vor mai fi permise in Romania, dar considera inexplicabil faptul ca ele au fost aprobate pentru anul 2006. Procedura de autorizare a cultivarii plantelor modificate genetic trebuie sa fie publica, in sensul ca publicul trebuie informat, iar in functie de observatiile primite se poate dovedi salutara

organizarea de dezbateri publice pe aceasta tema. Din pacate, la acest moment, in tara noastra nu exista posibilitatea trasabilitatii si etichetarii organismelor modificate genetic, ceea ce duce la o informare incorecta a consumatorilor, in conditiile in care un sondaj de opinie realizat de Asociatia pentru Protectia Consumatorilor din Romania indica faptul ca 98% dintre acestia ar dori ca produsele ce contin organisme modificate genetic sa poata fi etichetate. "Nu se cunosc pe efectele pe termen lung ale organismelor modificate genetic", spune Mencinicopschi, referindu-se la "**proba timpului**: timpul ne va spune daca aceste organisme modificate genetic s-au integrat bine in mediu". Nu sunt semnalate de catre forurile de cercetare efecte adverse asupra consumatorului sau mediului inconjurator. Dar, asa cum spunea mai sus, nu se cunosc efectele in timp. Mencinicopschi a dat explicat unde pot aparea semne de intrebare. Categoriile de organisme modificate genetic: La nivel de exploatare industriala, exista in special plante modificate genetic.

Avantaje si riscuri

Biotehnologiile reprezintă un mare potențial de îmbunătățire a calității vieții prin crearea de locuri de muncă ce necesită calificare înaltă, prin competitivitate și creștere economică, o mai bună îngrijire a sănătății, protejarea mediului și multe altele.

Sănătate: noi forme de diagnostic și tratament, în special boli care, astăzi, sunt necontrolabile; noi medicamente; eradicare de boli; profilaxia unor boli; înlocuiri de țesuturi și organe; noi servicii medicale.

Alimentație inclusiv agricultura: modificarea genetica a găsit un câmp larg de aplicare (porumb, soia etc); hrană umană și animală poate fi substanțial influențată iar nivelul utilizării pesticidelor și al fertilizatorilor se poate reduce, în mod substanțial; foamea și malnutriția s-ar putea să fie combătute eficient, daca politica va permite acest lucru (se stie ca adesea excedentul de alimente se distruge si nu se distribuie in zonele cu foamete).

Protecția mediului: bioremediere; procese și produse curate.

Alte domenii: materiale noi; prelucrare; energie; informație.

Și, totusi, **lumea se simte amenințată.** Unii își simt amenințate credințele, valorile și principiile etice, alții ființa biologică. Astfel, unii nu acceptă intervenția omului în structura genetică a nici unei ființe; o foarte mare parte consideră inacceptabilă clonarea umană dar acceptă animalul clonat; în timp ce aplicațiile în **medicină** sunt mai larg acceptate, foarte mulți văd un risc în domeniul agriculturii și al consumului alimentar. În fața unui astfel de val de îndoieli și temeri, venind dinspre cei ce îi înconjoară, se pot simți amenințați și cel ce dezvoltă știința și cel ce vrea să aplice rezultatele acesteia.

Consumatorul și Cercetătorul

Consumatorul nu are nici un mijloc de a testa și evalua, în mod direct, produsele ce conțin sau provin din OMG și nici efectele consumului de astfel de produse asupra sa și a familiei sale. De aceea, una dintre cele mai importante probleme ale sale, în legatură cu biotehnologiile și OMG, este aceea a încrederii pe care o are în metodele folosite în cercetare atunci când aceasta evaluează riscul pe care și-l asumă el atunci când consumă produse de genul celor de mai sus. Câștigarea încrederii consumatorului devine marea problema a cercetatorului, daca nu, cercetarea riscă o criză. Se pare ca este nevoie de mai multă informație dinspre cercetare spre consumator, mai multe eforturi de atragere a acestuia în formularea de programe de cercetare; secretomania erodeaza increderea in rezultatele cercetarilor.

Consumatorul și Producătorul

Producătorul este interesat în **biotehnologii**. Consumatorul este interesat în produse și servicii sigure, care nu îi afectează viața și sănătatea. Ca urmare, în practică, au apărut două tipuri de măsuri:

a) autorizarea produselor noi de catre o autoritate publică, în vederea introducerii lor pe piață;
b) etichetarea produselor.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

In acest fel, ***producătorul este nevoit să respecte standarde fără a fi oprit să aplice rezultatele cercetării*** precum şi să informeze prin etichete, consumatorul care rămâne liber să aleagă produsul ce-i convine cel mai mult.

Cercetătorul şi Producătorul

În ştiinţele vieţii, noile cunoştinţe se aplică în practică mai repede decât în oricare alt domeniu. Rezultate spectaculoase se obţin atunci când există o strânsă legătură între universităţi, organizaţii de cercetare şi întreprinderi, întrucât, se concentrează capacitate ştiinţifică, financiară şi de inovare.

În astfel de reţele de relaţii şi instituţii, efortul public este mai eficient direcţionat şi utilizat şi mai bine corelat cu efortul privat, beneficiile fiind pentru toţi. Planificarea şi competitivitatea firmei devine tot mai mult problema planificării şi competitivităţii din cercetare. O conditie esentiala este daca consumatorul vrea produsul, si aici intervine rolul reclamei.

IMM ar putea reprezenta o soluţie

Biotehnologiile s-au dezvoltat în întreprinderi atât mari cât şi mici. Multe întreprinderi mici au fost înfiinţate pentru a se obţine un singur produs/tehnologie pentru materializarea unei singure idei a unui cercetator, apoi au fost desfiinţate. A apărut deci, Cercetătorul-intreprinzător si vor fi tot mai mulţi. Dar acum, guvernul vrea sa le desfiinteze si pe cele ramase. Este nevoie de noi legi şi noi politici publice coerente, ca: înfiinţare/desfiinţare rapidă de firmă; facilitarea plecării din/revenirii în colective mari de cercetare; proprietate intelectuală; programe publice de cercetare pentru biotehnologii, insa este nevoie de responsabilitate socială.

În Uniunea Europeană, politicile şi reglementările privind OMG şi biotehnologiile s-au grefat pe un fond existent de standardizare, evaluarea conformitaţii, siguranţa produselor, siguranţa alimentară, protecţia consumatorului, cercetare etc.

Si în România va fi posibilă protecţia consumatorului în domeniul OMG dacă acesta va fi protejat şi în celelalte domenii. A aştepta însă, mai întâi, soluţii pentru domenii tradiţionale, fără a privi la viitorul care bate la uşă, ar putea însemna o pierdere mult prea mare pentru toţi. Pentru a asigura elaborarera şi aplicarea de politici publice care au sprijin social este nevoie de implicare şi comunicare între reprezentanţii diverselor categorii de interese: consumatori, cercetare, întreprinderi si autorităţile publice. Este nevoie de structuri de reprezentare puternice şi active.

In domeniul controversat al modificărilor genetice şi al biotehnologiilor este greu să existe consens, dar criza comunicării ar fi şi mai gravă.

Analiza nivelului de informare a populaţiei privind organismele modificate genetic
Luând în consideraţie faptul că 62% nu cunosc nimic despre existenţa produselor ce conţin sau provin din organisme modificate genetic, s-a constatat că un procentaj de 68% nu cunosc nimic nici despre medicamente provenite din organisme modificate genetic, un procentaj mai ridicat de 41% sunt de acord să consume produse care conţin organisme modificate genetic, deoarece ei nu consideră că aceste produse ar putea să-i influenţeze negativ sănătatea. Dar **medicamentele**? Ţinând cont că prin intermediul medicamentelor omul îşi tratează diferite afecţiuni şi chiar, în unele situaţii, îşi prelungeşte viaţa, situaţia este diferită. Prin urmare, constatăm o creştere a proportiei de persoane 58% care sunt de acord să consume medicamente care conţin organisme modificate genetic.

11. In loc de concluzii

Aşa zisa valoare nutriţională îmbunătăţită a culturilor OMG este, dupa unii autori, o poveste menită să ademenească credulii. Cauza principală a malnutriţiei pe glob este substituirea cu monoculturi industriale a culturilor diverse oferite de sistemul tradiţional. Practica agricolă intensivă distruge nutrienţii din sol, sărăcind culturile şi nu îmbogăţindu-le. Nici o tehnică a ingineriei genetice nu poate remedia situaţia. Numai revenirea la metodele tradiţionale de cultivare şi la biodiversitatea agricolă poate îmbunătăţi acest lucru, pe termen lung. Noi evidenţe indică faptul că ADN-ul transgenic, din praful şi polenul provenit din culturi OMG, se poate răspîndi la organismele din mediu, inclusiv la om.

DUNAREA DE JOS UNIVERSITY LIBRARY

Un fapt îmbucurător este acela că, în timp ce culturile OMG îşi demonstrează, rînd pe rînd, ineficacitatea, pe glob se dezvoltă şi prinde teren ideea de agricultură ecologică, atît în lumea a treia cît şi în Europa şi America de Nord. Cel mai mare experiment din istoria umanităţii a început odată cu aceste industrii iraţionale şi aberante iar terenul pe care se experimentează este însuşi sistemul ecologic de care depinde viaţa terestră; normal ar fi să beneficiem de roadele unei ştiinţe independente, care să se ocupe de găsirea unor soluţii cu adevărat viabile la problemele care frămîntă omenirea şi nu să coalizeze cu o industrie tehnologică al cărei unic scop este să faca profit. Avand in vedere faptul ca populatia Terrei a crescut si continua sa creasca peste posibilitatile de sustinere alimentara pe care le ofera agricultura, industria chimica si biotehnologia incearca sa preia controlul. Gigantii industriei farmaceutice se straduiesc si ei sa impuna guvernelor noul Codex alimentarius, care urmeaza sa interzica suplimentele alimentare, alicamentele, plantele aromatice si terapeutice etc., pentru a le inlocui cu chimicale de sinteza, cu pretextul ca acestea pot fi caracterizate chimic foarte exact, spre deosebire de produsele naturale. Dezbaterile sunt foarte aprinse, opozitia in special in Europa, este foarte puternica, dar interesele financiare sunt enorme.

Bibliografie

Ordeanu V. "Aspecte bio-medicale si farmaceutice privind organismele modificate genetic" conferinta la Workshop Biotehnologiile si industria farmaceutica, 16-18 mai 2009, Targu-Mures, Romania

Ordeanu V. "Aspecte bio-medicale si farmaceutice privind organismele modificate genetic" prelegeri la Cercul de Microbiologie farmaceutica, UMF Carol Davila, Bucuresti, 2010

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 10
ASIGURAREA CALITATII IN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

Documentarea sistemului de management al calitatii in laboratoarele microbiologice

De ce este necesara documentarea sistemului calitatii?

Pentru a demonstra tinerea sub control a proceselor se evalueaza conformitatea sistemului de management al calitatii cu cerintele specificate, pe baza dovezilor tangibile, furnizate de documentele sistemului. Documentatia sistemului permite evaluarea desfasurarii activitatilor curente, facilitand identificarea masurilor corective sau de imbunatatire necesare.

Ce sunt si cu ce se ocupa documentele sistemului calitatii?

Documentele sistemului calitatii sunt acte oficiale, cu caracter particula, care consemneaza, atesta, adeveresc, confirma, preconizeaza sau infatiseaza fapte si informatii.

Documentele calitatii au un rol practic:

De a descrie activitatile cu implicatii asupra calitatii si de a furniza certitudinea ca activitatile care concura la realizarea calitatii analizelor vor fi indeplinite efectiv, in mod planificat, eficient si controlat

De a permite verificarea independenta, obiectiva a activitatii descrise, in vederea imbunatatirii acesteia .

Pentru a putea fi utilizate efectiv si a putea fi tinute la zi se recomanda ca documentele sistemului calitatii sa fie limitate la strictul necesar.

Cum se redacteaza documentele sistemului calitatii?

Redactarea se face obligatoriu in scris, ca o conditie necesara de suport informational. Documentele sistemului caitatii nu trebuie sa complice modul de efectuare pana in prezent a activitatilor, ele sunt destinate intregului personal din cadrul laboratorului, carora trebuie sa li se asigure astfel accesabilitatea imedita, corecta si practic neingradita.

Redactarea trebuie sa fie cat se poate de accesibila, cuprinzatoare, clara si corecta. Stilul de redactare trebuie sa fie direct, simplu, cu fraze scurte, usor de inteles, fara formulari excesiv tehnice, sa nu lase loc de confuzii si interpretari. Se vor evita introduceri si formulari de tipul Este necesar, trebuie (documentele oglindesc o situatie existenta, nu una ce trebuie atinsa), etc. actiunile se formuleaza in mod imperativ. Fiecare document va fi codificat si elaborat pe formulare tipizate, stabilite in cadrul laboratorului. Documentele se revizuiesc periodic.

Sub ce forma se scriu documentele sistemului calitatii?

Orice laborator are o structura piramidala, iar pe de alta parte activitatile se succed in bucla calitatii. (figura 6)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

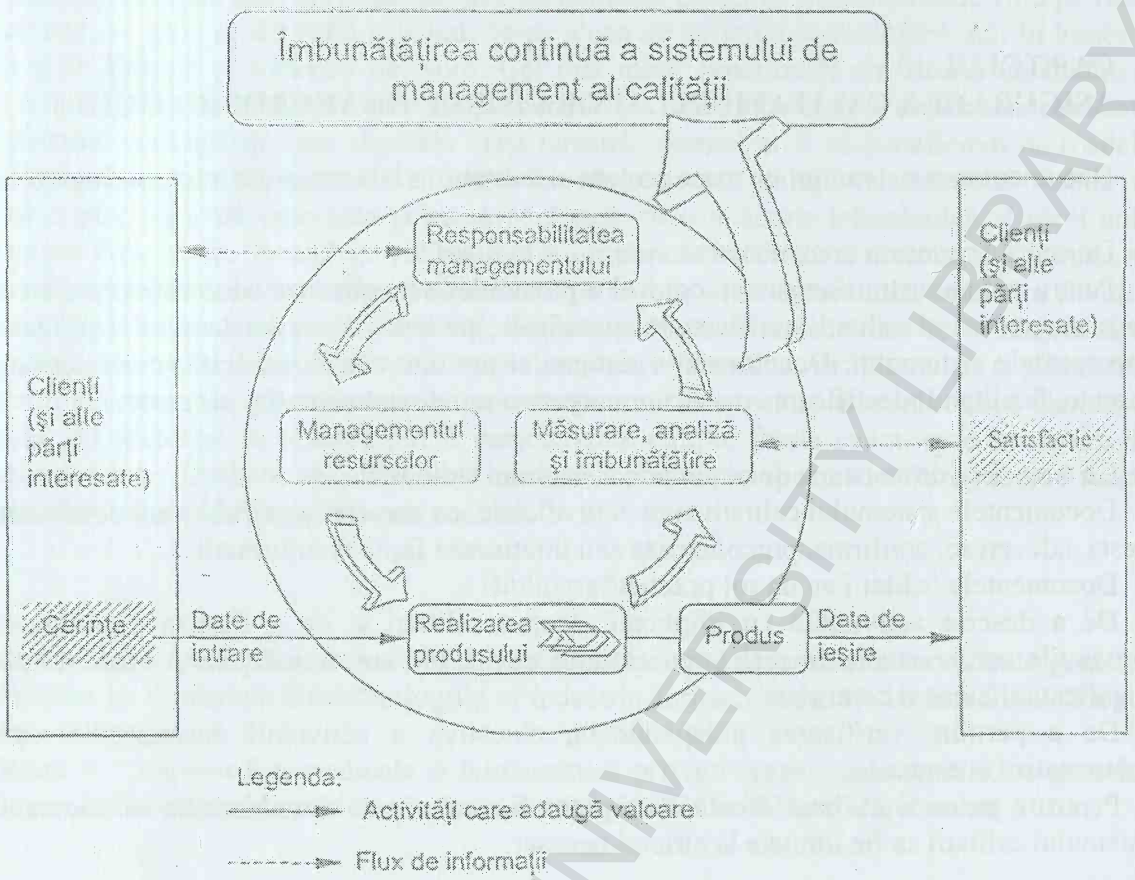


Figura 6. „Bucla calitatii"

Sistemul de management al calitatii poate fi asociat cu totalitatea activitatilor ce se desfasoara pe diferite niveluri ierarhice. Indiferent de gradul de complexitate al laboratorului pentru fiecare activitate se elaboreaza documente. Structura documentara a sistemului de management al calitatii a fi piramidala:

Inregistrari la calitatii, buletine, rapoarte la baza piramidei documentelor calitatii

Instructiuni de lucru, proceduri de operare

Procedurile documentale ale sistemului de management al calitatii: Controlul documentelor, Controlul înregistrărilor calității, Audituri interne, Controlul neconformității, Acțiuni corective, Acțiuni preventive.

Manualul calitatii

Declaratia conducerii privind politica in domeniul calitatii.

Tipurile de documente utilizate in sistemele de management al calitatii sunt:

Documente care furnizeaza informatii consecvente, atat pentru scopuri interne cat si pentru scopuri exteren, referitoare la sistemul de management al calitatii, denumite si manuale ale calitatii.

Documente care descriu cum se aplica sistemul de management al calitatii unei anumite metode de analiza, numite planurile calitatii;

Documente care stabilesc cerinte, astfel de documente sunt denumite specificatii;

Documente care stebilesc recomandari sau sugestii, astfel de documente sunt denumite specificatii;

Documente care furnizeaza informatii despre modul in care se realizeaza cu consecventa metodele de analiza, astfel de documente pot include proceduri documentate, instructiuni de lucru si desene;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Documente care furnizeaza dovezi obiective ale activitatilor efectuate sau ale rezultatelor obtinute, astfel de documente sunt denumite inregistrari.

Cerinte referitoare la sistemul de management al calitatii.

Documentatia sistemului calitatii trebuie sa includa:

Declaratii documentate ale politicii referitoare la calitate si ale obiectivelor calitatii;

Un manual al calitatii;

Proceduri documentate;

Documente necesare laboratorului pentru a se asigura de eficacitatea planificarii, operarii si controlului proceselor sale;

Inregistrari.

Manualul calitatii este principalul document utilizat in proiectarea si implementarea sistemului calitatii. El furnizeaza o descriere adecvata a sistemului de management al calitatii, servind totodata ca o referinta permanenta in implemetarea si mentinerea acestui sistem.

Manualul calitatii prezinta politica laboratorului privind calitatea si descrie sistemul de management al calitatii. Procesul de elaborare a manualului se identifica cu construirea sistemului.

Manualul calitatii se foloseste in scopul:

-Implemetarii efective a sistemului de management al calitatii;

-Definirii structurii organizatorice si a responsabilitatilor, pentru a asigurarea disciplinei, ordinii si eficacitatii ectivitatilor;

-Comunicarii politicii cu privire la calitate;

-Imbunatatirii comunicarii in interiorul, dar si in exterioarul laboratorului

-Instruirii unitare a personalului;

-Stabilirii unei baze pentru auditarea sistemului de management al calitatii verificandu-se astfel daca sistemul exista, functioneaza sau este adecvat scopului propus;

-Asigurarii unui acces rapid la documentele sistemului de management al calitatii si facilitarii gestionarii acestora.

Un caz special il reprezinta laboratoarele care manipuleaza microorganisme potential patogene (de sanatate publica sau de diagnostic clinic in ambulatorii, spitale etc.). Acestea nu pot fi autorizate daca nu poseda si nu aplica manuale proprii de biosiguranta sau de operatiuni care sa identifice pericolele cunoscute sau potentiale. De asemenea, trebuiesc stabilite procedurile specifice pentru reducerea la minimum si chiar eliminarea acestor pericole. Din acest motiv regulile GMT ("Good microbiological techniques") sunt fundamentale pentru siguranta activitatii in laboratorul de microbiologie.

2. Regulile de comportament in laboratorul de microbiologie

Una din cele mai importante etape o reprezinta stabilirea regulilor de comportament în spațiul în care se efectuează analizele microbiologice și în celelalte camere ale laboratorului microbiologic, în funcție de activitate, pentru asigurarea protecției personalului și a corectitudinii lucrului în laborator.:

Toate spațiile alocate laboratorului trebuie întreținute curate și fără alte materiale străine de activitățile laboratorului.

Curățenia laboratorului se face numai prin metoda umedă (lavetă îmbibată cu agent de curățare / dezinfectare).

La intrarea în spațiile de lucru trebuie să existe un ștergător de picioare șters cu dezinfectant.

În camerele:preluare probe, decontaminare, spălare materiale; pregătire sterilizare materiale și medii și citire, interpretare rezultate nu este permis să se intre fără echipament de protecție adecvat (halat alb, papuci albi de laborator), iar în spațiile în care se efectuează

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

analize microbiologice (hotă cu flux laminar, cameră control contaminare microbiană)este necesară purtarea unui echipament special pentru aceste spații (halat, botoşi sau alți papuci de laborator, capelină, mănuşi).

Dacă nu este necesar, în timpul lucrului, nu se trece dintr-o încăpere a laboratorului în alta, pentru a nu produce curenți de aer.

Este interzis a vorbi, a strănuta şi tuşi când se efectuează analize microbiologice.

Este interzis categoric să se mănânce, să se bea, să se fumeze în laborator.

Personalul va folosi numai spațiul şi utilajul care i-a fost alocat.

Nu se vor transporta materialele dintr-o încăpere în alta, dacă nu este nevoie.

Înainte de începerea lucrului se pregătesc toate materialele necesare pe masa de laborator.

De pe masa de lucru nu va lipsi cilindrul, vasul cu amestec sulfocromic sau dezinfectant pentru pipete infecte.

Toate tehnicile se execută astfel încât să se minimalizeze riscul formării aerosolilor şi picăturilor.

În timpul manipulării culturilor vii (izolate sau tulpini test) se vor folosi numai instrumente corespunzatoare: pense, anse, spatule etc. şi mănuşi de unică folosință de mărime potrivită. Toate manevrele se efectuează cu maximă atenție.

La însămânțări şi pasaje marginile eprubetelor, spatulele, ansele, trebuie totdeauna flambate.

După folosire, ansa se introduce în partea inferioară a becului de gaz şi apoi se sterilizează prin încălzire la roşu în partea superioară a flăcării.

Toate materialele contaminate, probele şi culturile se decontaminează înainte de aruncare sau spălare (în cazul reutilizării). În acest scop acestea se adună în recipiente speciale şi se transportă la autoclav, unde se sterilizează.

După lucru mănuşile de unică folosință, contaminate accidental, se îndepărtează aseptic şi se autoclavează inainte de a fi aruncate. Mănuşile reutilizabile se spală pe mână, se spală după scoaterea de pe mână, se curăță şi se dezinfectează înainte de utilizare.

Dacă se sparge un vas cu material infecțios sau culturi vii, se iau imediat măsuri de decontaminare (dezinfectare). Pe suprafața respectivă se aşează o lavetă îmbibată cu dezinfectant care se lasă să acționeze minim 15 min. Apoi se îndepărtează împreună cu cioburile într-un vas care se decontaminează. Imediat accidentul se raportează şefului de laborator, în nici un caz nu se ascunde.

Personalul trebuie să lucreze cu grijă şi să păstreze o curățenie riguroasă, decontaminând suprafețele de lucru după îndepărtarea materialelor periculoase şi la sfârşitul zilei de lucru.

Mâinile trebuie spălate şi dezinfectate, nu numai înainte şi după efectuarea analizelor, ci şi de câte ori este nevoie, inclusiv înainte de a părăsi laboratorul.

Culturile din banca de tulpini trebuie păstrate într-un frigider separat şi etichetat, iar acesta este accesibil numai persoanelor cu pregătire superioară.

Recipienții cu reactivi, coloranți, medii de cultură, dezinfectanți, etc. sunt inscripționați sau etichetați. Etichetele nu trebuie lipite prin umezire cu gura.

Modul de lucru în condiții aseptice:

Pentru efectuarea analizelor microbiologice se folosc sticlărie şi instrumentar de lucru sterile.

Înainte de începerea lucrului se verifică existența în spațiul de lucru a tuturor materialelor necesare, evitându-se deplasările în timpul lucrului.

Se evită trecerea dintr-o cameră în alta în timpul lucrului, pentru a nu produce curenți de aer.

Persoana care lucrează stă pe scaun, având poziționate, în față, flacăra şi în lateral materialele necesare.

Se evită aglomerarea de materiale inutile pe masa de lucru, astfel încât să nu existe obstacole între fluxul de aer steril şi câmpul de operare.

BUASTCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se inscripționează flacoanele, eprubetele, plăcile Petri cu numărul (numele probei), diluția, data, tipul de mediu.

Manipulările recipienților cu probe și a sticlăriei sterile se realizează cu maximum de grijă și atenție în imediata apropiere a becului de gaz, deasupra unei comprese îmbibată cu soluție dezinfectantă pe care vor cădea picăturile din produsul infectat în cazul unei greșeli de tehnică.

Conduita de lucru pentru inoculări

Eprubetele, flacoanele cu probe sau medii se manipulează astfel:

-eprubeta (flaconul) se ține în mâna stângă, iar dopul se scoate apucându-l de capăt, între degetul mic și podul palmei mâinii drepte, în care se ține și ansa sau pipeta;

-se arde gura eprubetei (flaconului) la flacără;

-se introduce în eprubetă ansa sau pipeta, după ce au fost flambate și se execută manopera de prelevare a probei;

-se flambează gura eprubetei și se închide;

-se deschide eprubeta (flaconul) cu mediu de cultură, ținând-o înclinată;

-se flambează gura eprubetei sau a flaconului și se inoculează;

-se flambează și se închide vasul inoculat;

-operatorul trebuie să aibă grijă ca în timpul manevrelor să nu deschidă accidental dopul recipienților cu care lucrează.

Înainte de utilizare, ansa de platină pentru inoculare se flambează la roșu în treimea superioară a flăcării astfel:

- se ține firul de platină vertical în flacără până se înroșește, apoi tija metalică se trece prin flacără de 2 - 3 ori, până la mâner.
- când flambarea se face înaintea începerii inoculării, ansa se răcește pe/sau în mediu steril sau pe pereții vasului.
- după inoculare ansa se arde pentru a o steriliza.
- inițial, ansa se introduce în partea inferioară a flacării și apoi în partea superioară.
- procedând în acest mod se evită diseminarea în aerul din jur și pe masă a produsului rămas pe ansă.
- trebuie arsă și tija metalică până la mâner.

Pipetele se manipulează în funcție de tip, după cum urmează:

-pipetele gradate sterile se desfac, de la capătul opus vârfului, din hârtia în care au fost învelite înainte de sterilizare și se trec ușor cu vârful prin flacără, de fiecare data când este introdusă pentru prima dată într-un recipient.

-dacă se lucrează cu pipeta Pasteur sterilă se trece prin flacără capătul prin care se aspiră, apoi se rupe vârful, trecând-o de mai multe ori prin flacără. Se încearcă dacă nu este fierbinte, suflând prin ea aerul pe mână, până nu mai arde.

-după utilizare, pipetele (indiferent de tip) se pun într-un vas cu amestec sulfo- cromic sau dezinfectant, unde se țin 24 ore.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă în timpul lucrului se produce un incident (vărsarea conținutului unei eprubete, pipete sau spargerea unui recipient cu probă sau germeni) este obligatoriu să se dezinfecteze cu Virkon, Cloramină, Deconex sau alt dezinfectant, care se lasă 15 minute să acționeze, după care se șterge suprafața respectivă. Laveta şi resturile strânse într-un vas se supun decontaminării.

Nu se lasă depozitate în nișa cu flux laminar materiale şi flacoane cu medii.

După fiecare episod de lucru, masa de lucru se dezinfectează şi se lasă lămpile UV aprinse cca 30 minute.

Însămânțarea în medii lichide:

Se realizează cu pipeta sau cu ansa (conduita de lucru fiind cea prezentată anterioar).

Când se lucrează cu ansa un produs vâscos, care se desface greu de pe ansă, sau când se pasează o cultură, ansa se duce până deasupra mediului şi se freacă bine de peretele eprubetei, spălând cu mediu picătura de produs astfel desfacută.

Însamânțarea pe medii solide:

Însămânțarea pe mediu înclinat:

-se introduce ansa cu produs până în fundul eprubetei, în lichidul de condensare.

-se plimbă ansa astfel încărcată pe suprafața mediului, de jos în sus, în zig-zag, având grijă să nu se zgârie mediul.

Însămânțarea pe mediu inclinat:

-acest mod de însămânțare se realizează pentru păstrarea tulpinilor de microorganisme;

-însămânțarea se face cu acul de însămânțare;

-se deschide eprubeta cu mediu şi se ține eprubeta cu gura în jos, pentru ca produsul să pătrundă după o linie perfect dreaptă.

Turnarea mediului în placa Petri:

- se lichefiază mediul în baie de apă;
- se răceşte mediul la 45° C;
- se toarnă la hota cu flux laminar, 10-15 ml de mediu în placa Petri, ținând capacul uşor ridicat într-o parte cu mâna stângă.
- se lasă să se solidifice.

Însămânțarea în plăci Petri:

-inițial se evaporă condensul de pe suprafața mediului prin menținerea plăcilor cca. 10-20 min la 35°C (în incubator), cu capacul întredeschis, placa fiind întoarsă.

-însămânțarea se poate face cu ansa, atingând uşor suprafața mediului în linii drepte, fără a-l zgâria;

-în cazul folosirii tehnicii sărăcirii ansei se încarcă o singură dată ansa şi, prin mişcări în zig-zag, se descarcă ansa, fără a o ridica, respectându-se împărțirea teoretică în 4 cadrane a plăcii Petri (dacă este cazul).

Realizarea diluțiilor zecimale:

Se cântăreşte 1g (10g) probă sau, după caz, se ia 1ml (10ml) probă, în condiții aseptice şi se introduce, cu o pipetă sterilă, într-o eprubetă (recipient) care conține 9 ml (90 ml) de diluant (dilutia10^{-1}).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se amestecă cu grijă proba de analizat cu soluția de diluare, fie prin aspirație-respingere, de 10 ori, cu o pipetă diferită, fie utilizând un agitator mecanic, timp de 5-10 sec. Frecvența de rotație a acestuia trebuie aleasă astfel încât lichidul în rotație să fie cu 2-3 cm sub marginea recipientului.

1 ml suspensie inițială (dilutia 10^{-1}) se introduce cu ajutorul unei noi pipete sterile într-o eprubetă ce conține 9 ml soluție de diluare sterilă, la temperatura adecvată, evitând orice contact între pipetă şi soluția de diluare, obținându-se astfel diluția 10^{-2}.

Se amestecă cu grijă conținutul eprubetei.

Dacă este necesar, se repetă aceste operații cu diluția 10^{-2} și cu diluțiile zecimale următoare, astfel încât să se obțină diluțiile 10^{-3}, 10^{-4} etc., până la obținerea numărului potrivit de microorganisme.

Atentie - Pentru fiecare diluție se foloseşte o nouă pipetă.

În general, diluțiile trebuie preparate din eşantionul pentru analiză, imediat înainte de analiză şi trebuie utilizate, pentru inocularea mediilor de cultură, în următoarele 30 minute de la preparare.

Mediul

Laboratorul microbiologic trebuie sa dispuna de spatii de testare (unde sunt efectuate testarile microbiologice specifice si activitatile asociate) si spatii auxiliare (intrari, coridoare, blocuri administrative, vestiare si toalete, camere de depozitare, arhive, etc). In general exista cerinte specifice de mediu pentru facilitatile de testare.

In functie de tipul de testare efectuata, accesul in laboratorul microbiologic trebuie restrictionat la personalul autorizat. Acolo unde asemenea restrictii sunt in vigoare, personalul trebuie atentionat cu privire la:

-utilizarea unei anumite zone;

-restrictiile impuse lucrului in asemenea zone;

-motivele impunerii unor asemenea restrictii;

-nivelele de izolare corespunzatoare.

Laboratorul trebuie aranjat astfel incat sa se minimizeze riscurile de contaminare incrucisata, acolo unde acestea sunt semnificative pentru tipul de test efectuat.

Validarea metodelor de testare microbiologica

Validarea metodelor de testare microbiologica trebuie sa reflecte conditiile reale de testare.

Laboratoarele de microbiologie farmaceutica au importanta functie de a descoperi, enumera si identifica microorganismele provenite de la diferite surse.

Indemanarea microbiologului si exactitatea, robustetetea si reproductibilitatea metodelor de analiza microbiologica folosite joaca un rol important in evaluarea calitatii unui medicament si a procesului sau de obtinere.

Din punct de vedere microbiologic se urmareste validarea urmatoarelor obiective:

Validarea procedurilor de determinare a incarcaturii microbiene. Incarcatura microbiana este o reflectie a modului in care este controlat microbiologic procesul tehnologic si deci validarea procedurilor este esentiala pentru intelegerea si masurarea mivelelor de incarcatura microbiana a medicamentului.

Validarea testelor de sterilitate pentru produs

Validarea metodelor microbiologice in acord cu urmatoarele aspecte:

Specificitate = fractiunea din numarul total de culturi sau colonii negative desemnate corect in prezumtiva inspectie.

Sensibilitatea = fractiunea din numarul total de culturi sau colonii pozitive desemnate corect in prezumtiva inspectie.

Exactitate, Repetabilitate = gradul de apropiere al acordului intre rezultatele masurarilor succesive ale aceluiasi masurand in aceleasi conditii de masurare.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reproductibilitate = gradul de apropiere al acordului intre rezultatele masurarilor aceluiasi masurand facute in conditii de masurare schimbate.

Limita de detectie (aplicata testelor microbiologice calitative) = numarul minim de microorganisme care pot fi detectate, dar in cifre care nu pot fi estimate precis.

Limita de determinare (aplicata testelor microbiologice cantitative) = numarul minim de microorganisme in cadrul unei variabilitati definite care poate fi determinat in conditiile experimentale ale metodei evaluate.

Deviatia negativa = se produce cand metoda alternativa da un rezultat negativ fara confirmare cand metoda de referinta da un rezultat pozitiv. Aceasta deviatie devine un rezultat fals negativ cand rezultatul real poate fi dovedit ca fiind pozitiv.

Deviatia pozitiva = se produce cand metoda alternativa da un rezultat pozitiv fara confirmare cand metoda de referinta da un rezultat negativ. Aceasta deviatie devine un rezultat fals pozitiv cand rezultatul real poate fi dovedit ca fiind negativ.

Limite cantitative,

Liniaritate,

Sensibilitate.

Validarea metodei este procesul prin care se stabileste ca totalitatea caracteristiiclor de performanta ale metodei de analiza respective corespund utilizarii intentionate. Toate experimentele utilizate pentru a trage concluzii asupra valabilitatii unei metode trebuie sa fie documentate intr-un raport. Rezultatele trebuie evaluate cu metode statistice corespunzatoare.

Chiar cand validarea s-a incheiat, utilizatorul va trebui sa verifice in mod regulat ca performantele documentate pot fi atinse, de exemplu prin utilizarea unor mostre contaminate controlat sau prin materiale de referinta care incorporeaza matrici relevante.

Incertitudinea de masurare

Testele microbiologice intra in categoria celor care exclud calculul riguros, metrologic si statistic valid al incertitudinii de masurare. Estimarea incertitudinii se bazeaza pe datele de repetabilitate si reproductibilitate. Unele componente (de ex.efectele de pipetare, cantarire si dilutie) pot fi gata masurate si usor evaluate pentru a demonstra o contributie neglijabila la incertitudinea globala. Alte componente (de ex.stabilitatea mostrelor si prepararea mostrelor) nu pot fi masurate direct si contributia lor nu poate fi evaluata intr-o maniera statistica , dar nu trebuie omisa importanta lor in variabilitatea rezultatelor.

Echipamentul – intretinere, calibrare si verificarea performantelor

Un laborator microbiologic trebuie sa desfasoare un program documentat pentru intretinerea, calibrarea si verificarea performantelor echipamentelor sale.

Intretinerea echipamentului esential va fi facuta la intervale specificate determinate de factori cum ar fi rata de utilizare.

Trebuie elaborat Planul Master de Validare care defineste modul in care se realizeaza politica de validare a laboratorului microbiologic si care are in vedere stabilirea si asigurarea unei evidente documentate, conform careia:

noile sisteme si echipamente destinate analizei produselor medicamentoase, sunt instalate si functioneaza în acord cu cerintele Regulilor de Buna Practica de Laborator.

metodele de analiza in parametri stabiliti, pot sa functioneze efectiv si reproductibil si pot duce la obtinerea unor rezultate care sa indeplineasca specificatiile stabilite si atributele calitatii.

Planul Master de Validare cuprinde planificarea, executarea si documentarea activitatilor prevazute pentru calificarea tuturor sistemelor, echipamentelor si validarea metodelor de analiza din cadrul laboratorului microbiologic, care pot avea un impact asupra calitatii, eficacitatii si sigurantei rezultatelor obtinute .

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Trebuie avute in vedere urmatoarele etape in realizarea validarii proceselor de analiza :

Etapa 1-a

Inaintea inceperii activitatilor de analiza propriu zise, se asigura ca:

- facilitatile corespund cerintelor RBPL si sunt adecvate scopului propus
- utilitatile critice cu impact asupra calitatii, sigurantei si eficacitatii analizei sunt constant reproductibile, respectiv procesele de obtinere a utilitatilor critice sunt calificate.

Etapa a 2-a

Calificarea echipamentelor critice si a sistemelor auxiliare se realizeaza, efectuand urmatoarele activitati, individual sau combinate:

Calificarea la instalare - CI: verificarea pe baza de documente, care sa ateste ca echipamentele si sistemele instalate sau modificate sunt conforme cu proiectul aprobat si cu recomandarile producatorului si / sau ale utilizatorului Calificarea functionarii – CF: verificarea pe baza de documente, care sa ateste ca echipamentele si sistemele instalate sau modificate, functioneaza in limitele stabilite anticipat, cuprinde doua etape Calificare Operationala si Calificarea Performantei. Ambele activitati sunt conduse pe baza unui protocol de calificare elaborat conform procedurilor standard de operare specifice; protocolul de calificare specifica operatiile si echipamentul / sistemul care sunt calificate, functiile acestora in proces, criteriile de acceptanta pe care echipamentul / sistemul le indeplineste si metodologia verificarilor si testelor la care echipamentul / sistemul este supus.

Etapa a 3-a

Validarea metodei de analiza conform unui protocol de validare bine definit. Validarea se efectueaza utilizand echipamente de analiza, calificate conform RBPL. Conditiile de lucru validate sunt identice cu conditiile aplicate in cadrul studiului bioanalitic.

Etapa a 4-a

Revizuirea periodica a sistemelor calificate. Sistemele si echipamentele sunt evaluate periodic pentru a verifica daca mai opereaza intr-un mod valid.

Activitatile de validare cuprinse in programul de validare sunt executate de catre colectivul de specialisti din cadrul laboratorului.
Sarcina colectivului de validare este de a elabora dosarele de validare, de a executa testele si verificarile prestabilite.

Rezultatele obtinute sunt comparate cu criteriile de acceptanta enuntate iar in cazul constatarii unor neconformitati, sunt intocmite rapoarte de deviatie pe baza carora, colectivul de validare determina executarea actiunilor corective, care se impun.

Ultima etapa de lucru o constituie elaborarea rapoartelor de validare, in care comentariile si concluziile sunt formulate pe baza datelor inregistrate si prelucrate in cursul activitatii de validare.

Dosarele de validare includ toate datele originale rezultate din verificari si teste si fiecare alt document important care caracterizeaza sistemele sau echipamentele calificate sau validate. Datele primare sunt colectate pe foi de lucru si caiete, semnate si datate de catre executant; foile de date suplimentare si foile de date generate de sistem în timpul executarii protocolului, sunt atasate la protocol, fiecare pagina fiind prevazuta cu elemente de identificare specifice.

Periodic se executa verificarea sistemelor si echipamentelor, pentru a se confirma, ca acestea îndeplinesc cerintele prescrise si pentru a avea certitudinea ca eventuale schimbari, introduse in acord cu sistemul de schimbare, nu afecteaza negativ caracteristicile analizei si calitatea rezultatelor validarii metodelor analitice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O atentie deosebita trebuie acordata evitarii contaminarii incrucisate datorate echipamentului, de exemplu:

-echipamentul disponibil trebuie sa fie curat si steril atunci cand este cazul ;

-sticlaria refolosita trebuie curatata corespunzator si sterilizata atunci cand este cazul;

-laboratoarele ar trebui dotate cu un autoclav separat pentru decontaminare. Totusi, un singur autoclav este acceptabil presupunand ca sunt luate masuri de precautie adecvate pentru a separa incarcaturile de decontaminare si de sterilizare, si exista un program documentat de curatare care se adreseaza atat mediului intern, cat si celui extern al autoclavului.

Bibliografie:

(1) SR EN ISO 9000: 2006, Sisteme de management al calității. Principii fundamentale şi vocabular.

(2) SR EN ISO 9001: 2001, Sisteme de management al calității. Cerințe.

(3) SR EN ISO /CEI 17025:2005, Cerinte generale pentru competenta laboratoarelor de incercari si etalonari.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INDEX DE TERMENI pagina

antibiograma 78
antibiotic 51
antimicrobian 34
calitate in laborator 158
dezinfectant 51
igienico-sanitar 107
infectie 7
infectii nosocomiale 31
medicamente 21
OMG 131
rezistenta la infectii 31
rezistenta microbiana 34
sensibilitate 78

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Director: Dr.Ing. V.L. Purcarea
Secretar Stiintific: Conf.Dr. Bogdan Voiculescu
Tehnoredactare: Petrut Radu
Coperta: Petrut Radu

Format: A4
Bun de tipar: noiembrie 2010, Aparut: 2010
© Copyright 2010
Toate drepturile apartin Editurii Universitare „Carol Davila"

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

ISBN:978-973-708-324-1

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY